

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/21214 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/18, A61P 9/00, 9/10, 25/00, 25/28, 43/00 // A61K 35/76
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06347
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 18 日 (18.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/267024 1999年9月21日 (21.09.1999) JP  
特願2000/241205 2000年8月9日 (09.08.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メドジェン バイオサイエンス株式会社 (MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番C-1101号 Osaka (JP).
- (72) 出願人 および  
(22) 発明者: 森下 竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 荻原俊男 (OGI-HARA, Toshio) [JP/JP]; 〒562-0046 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE THERAPY FOR CEREBROVASCULAR DISORDERS

(54) 発明の名称: 脳血管障害のための遺伝子治療

(57) Abstract: Cerebrovascular disorders (cerebrovascular obstruction, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, cerebral attack, cerebral hemorrhage, Willis' circle occlusion, cerebrovascular dementia, Alzheimer's dementia, etc.) can be efficaciously treated or prevented by transferring an HGF (hepatocyte growth factor) gene and/or a VEGF (vascular endothelial growth factor) gene into the subarachnoidal space of humans.

(57) 要約:

HGF (肝実質細胞増殖因子) 遺伝子及び/又はVEGF (血管内皮増殖因子) 遺伝子をヒトのクモ膜下腔に導入することにより、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆等の脳血管障害を有効に治療又は予防することができる。

WO 01/21214 A1

## 明 細 書

## 脳血管障害のための遺伝子治療

## 技術分野

- 5 本発明は、脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGF（肝実質細胞増殖因子）遺伝子及び/又はVEGF（血管内皮増殖因子）遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などに関する。

## 10 背景技術

- 脳動脈のアテローム性動脈硬化症によって引き起こされる脳閉塞性疾患、もやもや病等はしばしば脳の慢性的な血流量低下を引き起こす。この状態から、その後の脳虚血性事象だけでなく痴呆を含む神経病理学的変化に至ることがある（Stroke 25, 1022-1027、Stroke 29, 1058-1062(1998)、Stroke 24, 259-264(1993)、Ann. N. Y. Acad. Sci. 695, 190-193(1993)）。しかし、これらの脳血管性障害における血流量低下を改善する有効な治療法は未だ確立されていない。虚血性発作においては、特に虚血周辺部で活発な血管新生を生じさせることが知られており、そしてこれはヒトのより長期の生存に参与している（Stroke 25, 1794-1798(1994)）。それ故血管新生は、脳虚血症の回復や将来の発作予防に
- 20 おいて重要な役割を果たすと考えられている。

新しい血管の発生や血管新生は親血管の内皮細胞の活性化と共に開始されるが、インビボでこの血管新生を刺激するだけでなく、インビトロで内皮細胞に対してマイトジェニックであることが示されている増殖因子を「血管新生増殖因子」と称している。

- 25 血管新生増殖因子の治療的な関与は、Folksmanらによって最初に文献発表された（N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186(1971)）。またその後の研究によって、組換え血管新生因子、例えば繊維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリー（Science 257, 1401-1403(1992)、Nature 362, 844-846(1993)）、内皮細胞増殖因子（J. Surg. Res. 54, 575-583(1993)）、及び血管内皮増殖因子（VEGF）などを使

用して心筋及び後肢虚血症の動物モデルにおける側副血行路の発達を促進及び、又は増進させ得ることが確認されている (Circulation 90, II-228-II-234(1994))。さらに本発明者らは、HGFがVEGFと同様に内皮特異的増殖因子として作用することを見出している (J. Hypertens. 14, 1067-1072(1996))。

- 5 血管障害を治療するために前記の如き血管新生増殖因子を用いる戦略は、「治療的血管新生」と称されている。より最近では、この戦略はヒトの虚血性疾患に適用されている。しかしながら、脳虚血症に対してもこの戦略が有効であるかどうかは、今日までのところ知られていない。

- 肝細胞増殖因子 (HGF) は、多様な細胞に対して分裂誘発活性、運動性促進  
10 活性及び形態形成活性を示すプレイオトロフィックなサイトカインである (Nature 342, 440-443(1989))。

- HGFの脳における作用については、以下のような報告がなされている。すなわち、HGFと膜貫通型チロシンキナーゼのc-Met、HGFレセプターは共に  
15 脳の種々の領域で発現しており、HGFとc-Met間の機能的な結合によって初代培養海馬のニューロンの生存が高められることや、インビトロでのニューロン発達において神経突起の伸長が誘導されることが知られている (J. Cell. Biol. 126, 485-494(1994)、特開平7-89869号公報)。最近、HGFが虚血中のニューロン内で誘導されることが報告されており (Brain Res. 799, 311-316(1998))、また組換えHGFが海馬における虚血後の遅発性神経細胞死に対  
20 して神経保護効果を有していることや、組換えHGFを脳内に連続的に注入することにより梗塞の大きさの減少に有効であったことが報告されている (J. Cereb. Blood Flow Metab. 18, 345-348(1998))。これらの知見から、HGFは脳虚血中の重要な神経栄養因子として作用するものと考えられる。

- 他方、血管内皮増殖因子 (VEGF) は、内皮細胞に対してマイトジェニック  
25 な二量体糖タンパク質であり、そして血管透過性を高める能力を有している。VEGFは内皮細胞に対して直接的且つ特異的なマイトジェニックな効果を有している (Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851-858 (1989))。チロシンキナーゼレセプターFlt-1、Flk-1及びKDRを含むVEGFの結合部位は、他のタイプの細胞ではなく内皮細胞上に存在しているため、VEGFの効果は内皮細胞

に限定されている。

VEGFの脳における作用に関しては、中枢神経系においてVEGFは虚血性障害によって脳内に急速に誘導されることが報告されており (Mol. Cell. Biol., 16, 4604-4613 (1996))、また組換えVEGFの脳表面への投与が、梗塞量の減少に有効であったことが報告されている (J. Cereb. Blood Flow Metab. 18, 887-895 (1998))。しかし詳しいことは分かっていない。

以上のようなHGFおよびVEGFの作用の他、別の観点からは、前述の如くこれらの因子は強力な血管新生増殖因子である (J. Cell. Biol. 119, 629-641 (1992)、Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 851-858 (1989))。虚血性発作は、特に虚血周辺部で活発な血管新生を生じさせることが知られており、そしてこれはヒトのより長期の生存と関係している (Stroke 25, 1794-1798 (1994))。それ故、血管新生は脳虚血症の回復や将来の発作予防で重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、脳虚血症等に対して実際に組換えHGFやVEGFを用いた治療的血管新生が可能かどうかについては知られていない。さらに、組換え血管新生増殖因子は急速に消失するので脳内に連続的に注入しなければならず、そしてこの操作は臨床状況下ではかなり危険であり、非現実的である。それ故、遺伝子導入技術を適用して虚血性の脳内や周辺で血管新生増殖因子を持続して発現及び分泌できれば合理的であると考えられる。しかしながら、HGF遺伝子やVEGF遺伝子の脳虚血性障害への適用 (遺伝子治療) については全く例がなく、また脳という組織の特殊性を反映してか、現在までのところその適用性に関して

#### 発明の開示

本発明は、脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGF (肝実質細胞増殖因子) 遺伝子及び/又はVEGF (血管内皮増殖因子) 遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などに関する。

本発明者らは、HGF及びVEGFの遺伝子導入によって、虚血状態の脳表面に血管新生を誘導することができるかどうかを *in vivo* で検討した。その結果、

- (a) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクション後、長期間にわたってこれらのタンパク質が脳内で検出されること、(b) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクションによる治療法により虚血状態の脳表面に血管新生を誘導できること、(c) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子のトランスフェクションが血管の閉塞によって引き起こされる脳の血流量低下を治療するのに有効であること、そして(d) この治療法は、閉塞前に実施したときも有効であることを明らかにした。更に、これらの遺伝子導入はクモ膜下腔への導入という新しい投与方法により効率的に達成されることも明らかにした。

- 加えて本発明者らは、虚血による海馬CA-1領域の遅発性神経細胞死が、HGF遺伝子導入により抑制されることをも見出した。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明により、以下の(1)から(23)の発明が提供される。

- (1) HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳血管障害の治療又は予防剤、
- 15 (2) 脳血管障害が、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症である、上記(1)記載の治療又は予防剤、
- (3) HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血流量低下の治療又は予防剤、
- 20 (4) HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血管新生促進剤、
- (5) HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞死の抑制剤、
- (6) 脳の神経細胞死が脳虚血に起因する遅発性神経細胞死である、上記(5)記載の抑制剤、
- 25 (7) HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤、
- (8) HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパク及び/又はVEGFタンパクとの併用に供するための、上記(1)～(7)いずれかに記載の剤、

- (9) HGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパクとの併用に供するための、上記(8)記載の剤、
- (10) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子がHVJーリポソームの形態にある、上記(1)～(9)いずれかに記載の剤、
- 5 (11) クモ膜下腔へ投与するための、上記(1)～(10)いずれかに記載の剤、
- (12) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子と薬学的に許容しうる溶剤とを混合することからなる、上記(1)～(11)のいずれかに記載の剤の製造方法、
- (13) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、
- 10 脳血管障害の治療又は予防法、
- (14) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の血流量低下の治療又は予防法、
- (15) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の血管新生促進法、
- 15 (16) HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞死の抑制法、
- (17) HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞のアポトーシス抑制法、
- (18) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトのクモ膜下腔へ投与する、上記(13)～(17)のいずれかに記載の方法、
- 20 (19) HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパク及び／又はVEGFタンパクを投与する、上記(13)～(18)のいずれかに記載の方法、
- (20) HGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパクを投与する、上記(19)記載の方法、
- 25 (21) 脳血管障害の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用、
- (22) 脳の血流量低下の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用、
- (23) 脳の血管新生促進剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺

伝子の使用、

(24) 脳の神経細胞死の抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用、

(25) 脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。

図面の簡単な説明

5 図1は、脳表面の $\beta$ -gal ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)の発現を示す生物の形態写真である。下、HVJ-リボソーム (1ml)の内頸動脈内注入；中、HVJ-リボソーム (100 $\mu$ l)の大槽 (クモ膜下腔)内注入；上、HVJ-リボソーム (20 $\mu$ l)の側脳室注入。各群、n=4。

図2は、脳内の $\beta$ -gal ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)の発現を示す生物の形態写真  
10 である。左、内頸動脈内注入；中、側脳室注入；右、大槽 (クモ膜下腔)内注入。

図3は、エリザ法によるラット脳脊髄液中でのヒトHGFのインビボタンパク質発現を示すグラフである。図中、UTはHGF遺伝子を含まない発現ベクターで処置したラットを、7dはHGF遺伝子導入7日目のラットを、14dはHGF遺伝子導入14日目のラットを示す。また図中、-は頸動脈の閉塞無しを、また+は閉塞有りを示す。縦軸はHGFの濃度 (ng/ml)を示す。\*: UT  
15 に対して $P<0.01$ 。各群、n=4。

図4は、エリザ法によるラット脳脊髄液中でのヒトVEGFのインビボタンパク質発現を示すグラフである。図中、UTはVEGF遺伝子を含まない発現ベクターで処置したラットを、7dはVEGF遺伝子導入7日目のラットを、14d  
20 はVEGF遺伝子導入14日目のラットを示す。また図中、-は頸動脈の閉塞無しを、また+は閉塞有りを示す。縦軸はVEGFの濃度 (pg/ml)を示す。  
\*: UTに対して $P<0.01$ 。各群、n=4。

図5は、HGF遺伝子のトランスフェクション前及び7日後の脳内及び周辺の内皮細胞に対する細胞組織化学的染色の結果を示す顕微鏡写真である。A (上  
25 左)、頸動脈を閉塞しないでベクター (HGF遺伝子を含まない発現ベクター)をトランスフェクションした脳；B (上右)、頸動脈を閉塞しないでHGF遺伝子をトランスフェクションした脳；C (下左)、頸動脈閉塞後7日目のベクターをトランスフェクションした脳；D (下右)、頸動脈閉塞後7日目のHGF遺伝子をトランスフェクションした脳。各群、n=4。

図6は、レーザードップラーイメージャー(LDI)で測定した脳血流の時間経過を示すグラフである。図中、preは閉塞前を、postは頸動脈閉塞直後を、7dは閉塞7日後を、14dは閉塞14日後の結果を示す。縦軸(FLUX)は脳灌流平均値を示す。preに対して、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。各群、 $n = 6$ 。

- 5 図7は、頸動脈閉塞後7日目にLDIで測定したCBFを示すグラフである。図中、UTは発現ベクターで処置したラットを、RCは組換えHGF(200 $\mu$ g)で処置したラットを、GENEはHGF遺伝子(10 $\mu$ g)で処置したラットを、GENE&RCは組換えHGF(200 $\mu$ g)とHGF遺伝子(10 $\mu$ g)で処置したラットを、またVEGFにおけるGENEはVEGF遺伝子(20 $\mu$ g/ml)で処置したラットの結果を示す。また縦軸(FLUX)は脳灌流平均値を示す。UT  
10 に対して、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。各群、 $n = 6$ 。

- 図8は、頸動脈の閉塞前及び直後にLDIで測定したCBFを示すグラフである。図中preは、対照ラットの頸動脈閉塞前を、postは対照ラットの頸動脈閉塞直後を、HGFは動脈閉塞7日前にHGFトランスフェクションを行ったラットの頸動脈閉塞直後の結果を、VEGFは動脈閉塞7日前にVEGFトランスフェクションを行ったラットの頸動脈閉塞直後の結果を示す。postに対して、\*\* $P < 0.01$ 。各群、 $n = 5$ 。
- 15

図9は、脳表面(図中Brain surface)及び海馬CA-1領域(図中CA1)の $\beta$ -gal( $\beta$ -ガラクトシターゼ)の発現を示す、顕微鏡写真である。

- 20 図10は、両側頸動脈の虚血刺激により、海馬CA-1領域に遅発性神経細胞死が認められた結果を示す、顕微鏡写真である。図中、Sham ope. 7daysはコントロール(外科処置のみで虚血刺激なし)7日目の結果を、またVehicle(4days, 7days)は両側頸動脈虚血後4日目及び7日目の結果を、それぞれ示す。

- 図11は、両側頸動脈虚血刺激の前後にHGF遺伝子あるいは組換えHGFタンパクを導入することにより、海馬CA-1領域の遅発性神経細胞死が抑制された結果を示す、顕微鏡写真である。図中、Post HGF gene(4days, 7days)は両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した4日目及び7日目の結果を、Pre HGF gene 7daysは両側頸動脈虚血直前にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、またr-HGF 7daysは両側頸動脈虚血直後に組換えHGFタンパクを導入した7日目の結果を、それぞれ示す。
- 25



す。

図12は、生存している神経細胞を染色することにより、海馬CA-1領域の神経細胞密度を測定した結果を示すグラフである。図中、縦軸は細胞密度（生存神経細胞数/mm）を示す。また横軸におけるshamはコントロール（虚血刺激なし）の結果を、vehicleは両側頸動脈虚血の結果を、Post Gは両側頸動脈虚血後にHGF遺伝子を導入した結果を、Pre Gは両側頸動脈虚血前にHGF遺伝子を導入した結果を、またPost Rは両側頸動脈虚血後に組換えHGFタンパクを導入した結果を、それぞれ示す。vehicleに対して、\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ 。

図13は、両側頸動脈虚血後にHGF遺伝子を導入し、7日後の脳脊髄液中のHGFのタンパク濃度をELISA法により測定した結果を示すグラフである。図中、縦軸はHGFのタンパク濃度（ng/ml）を示し、また横軸中post HGFはHGF遺伝子導入の結果を、shamはコントロール（虚血刺激なし）の結果を、それぞれ示す。またN.D.は検出されなかった結果を示す。

図14は、海馬CA-1領域におけるC-Metの発現を、免疫染色法により解析した結果を示す、顕微鏡写真である。

図15は、海馬CA-1領域においてアポトーシスを起こした神経細胞をTUNEL法により染色した結果を示す、顕微鏡写真である。図中、DND 7daysは両側頸動脈虚血後7日目遅発性神経細胞死を起こした神経細胞を、Post HGF gene 7daysは両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、またPre HGF gene 7daysは両側頸動脈虚血直前にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、それぞれ示す。

図16は、海馬CA-1領域におけるBcl-xLの発現を免疫染色法により解析した結果を示す、顕微鏡写真である。図中、sham.はコントロール（虚血刺激なし）の結果を、post HGF（4days, 7days）は両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した4日目及び7日目の結果を、それぞれ示す。

図17は、両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入後7日目の、海馬CA-1領域におけるHSP70の発現を、免疫染色により解析した結果を示す顕微鏡写真である。

図18は、海馬CA-1領域におけるHSP70の発現を、免疫染色により解析した結果を示す顕微鏡写真である。図中Sham.はコントロール（虚血刺激なし）の結果

を、Post HGF 7Dは両側頸動脈虚血直後にHGF遺伝子を導入した7日目の結果を、それぞれ示す。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明において使用される「HGF遺伝子」とは、HGF（HGFタンパク）
- 5 を発現可能な遺伝子を指す。具体的には、Nature, 342, 440(1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 321(1990)などに記載のHGFのcDNAを後述の如き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが挙げられる。ここでHGFをコードするcDNAの塩基配列は、前記文献
- 10 に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory
- 15 Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

- さらに、本発明のHGF遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質がHGFと実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明のHGF遺伝子として使用できる。すなわち、1) 前記cDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAや、2) 前記cDNAによりコードされるタン
- 20 パク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数（好ましくは数個）のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、などのうち、HGFとしての作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明のHGF遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記1) 及び2) のDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼ
- 25 ーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

発明において使用される「VEGF遺伝子」とは、VEGF（VEGFタンパク）を発現可能な遺伝子を指す。すなわち、VEGFのcDNAを後述の如き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだもの

が例示される。VEGF遺伝子は、ヒトにおいては転写に際しての選択的スプライシングにより、4種類のサブタイプ(VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206)の存在が報告されている(Science, 219, 983(1983)、J. Clin. Invest., 84, 1470(1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851(1989))。本発明においてはこれら5のいずれのVEGF遺伝子をも使用することが可能であるが、生物学的に最も活性が強いという観点から、VEGF165遺伝子がより好ましい。さらに前記のHGFの場合と同様に、これらVEGFの遺伝子に対して改変等を施した遺伝子であっても、VEGFとしての作用を有するタンパクをコードする遺伝子である限り、本発明のVEGF遺伝子の範疇に含まれる。

- 10 当該VEGF遺伝子もHGF遺伝子と同様に、文献(例えばScience, 246, 1306(1989))記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。

本発明においては、HGF遺伝子又はVEGF遺伝子により、脳血管障害が治療又は予防されることを初めて明らかにしたものである。すなわち本発明において初めて、(a) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクション後、長期間にわたってこれらのタンパク質が脳内で検出されること、(b) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクションによる治療法により虚血状態の脳表面に血管新生を誘導できること、(c) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子のトランスフェクションが血管の閉塞によって引き起こされる脳の血流量低下を治療するの20に有効であること、そして(d) この治療法は、閉塞前に実施したときも有効であることを明らかにした。従ってHGF遺伝子及びVEGF遺伝子は、脳虚血に起因する障害、脳の血流量低下を伴う障害、脳の血管新生を促進することにより改善が期待される障害等の、種々の脳血管障害に対する治療又は予防剤として、25有効に使用される。

具体的には、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中(クモ膜下出血や一過性脳虚血、脳動脈硬化症などを含む)、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症などの治療または予防剤として有効に使用される(以下、本発明の治療又は予防剤を単に遺伝子治療剤と

称することもある)。

- さらに本発明者らは、虚血による海馬CA-1領域の遅発性神経細胞死が、HGF遺伝子導入により抑制されること、すなわちHGF遺伝子が脳の神経細胞死を抑制する効果を有することを見出した。そしてこの効果は、c-Metを介した神経細胞のアポトーシス抑制効果に基づくものであることを明らかにした。

ここで海馬CA-1領域とは神経の密集した領域であり、脳虚血による神経細胞死を受け易い領域として知られている。このようにHGF遺伝子は、血管新生作用(血流量低下抑制作用)および神経細胞保護作用の双方の作用に基づき、脳血管障害の治療および予防を達成できることが明らかとなった。

- またHGF遺伝子は、前記のようにc-Metを介した神経細胞保護効果を有しているため、例えばアルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症、筋萎縮性側索硬化症、あるいはパーキンソン氏病といった神経変性疾患の治療又は予防剤としても、有効に使用することができる。

- 本発明においては、HGF遺伝子、VEGF遺伝子各々単独で用いることもできれば、両者を併用して使用することも可能である。また、他の血管内皮増殖因子の遺伝子と共に用いることもできる。さらに、HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子と、HGFタンパク及び/又はVEGFタンパクとを併用することも可能である。好ましくはHGF遺伝子とHGFタンパクとの組み合わせ、又はVEGF遺伝子とVEGFタンパクとの組み合わせであり、さらに好ましくはHGF遺伝子とHGFタンパクとの組み合わせである。これに関しては後述の実施例4を参照されたい。

- なお、ここで用いるHGFタンパクとしては、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば如何なる方法で調製されたものでも良く、また市販品(例えば東洋紡績株式会社、Code No. HGF-101等)を使用することもできる。前記クローニングにより得られたHGFのcDNAを適当な発現ベクターに挿入し、これを宿主細胞に導入して形質転換体を得、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFタンパクを得ることができる(例えばNatue, 342, 440(1989)、特許第2777678号等参照)。またVEGFタンパクも同様にして得ることができる。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

- 前記遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与法が詳しく解説されている（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ディー・エス、1999）。以下、具体的に説明する。

#### A. 非ウイルスベクターを用いる場合

- 10 慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

- 細胞への遺伝子導入法としては、リポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法などが挙げられる。

- また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム（internal type liposome）による遺伝子導入法、静電気型リポソーム（electrostatic type liposome）による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法（HVJ-AVEリポソーム法）、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体（金属粒子）とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

- このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス（Hemagglutinating virus of Japan : HVJ）とを融合させたものである。当該HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ-リポソームの調製法については文献（実験医学別冊、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997、J. Clin. Invest. 93, 1458-

1464(1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220(1996))などに詳しく述べられており、また後述の実施例にも詳しく記載されているため、それらを参照されたい。なおH V JとしてはZ株(ATCCより入手可能)が好ましいが、基本的には他のH V J株(例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など)も用いることができる。

- 5 さらに、n a k e d-DNAの直接導入法は、上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点から好ましい導入法である。

ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えば p C A G G S (Gene 108, 193-200(1991)) や、p B K-CMV、p c D N A 3. 1、  
10 p Z e o S V (インビトロゲン社、ストラタジーン社)などの発現ベクターが挙げられる。

#### B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無  
15 毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV 40、免疫不全症ウイルス(H I V)等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

- 20 前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する i n v i v o 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺  
25 伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す e x v i v o 法がある  
(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、ニス・ディー・エス、1999)。本発明では、i n v i v o 法が好ましい。

患者への投与部位としては、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与部位が選択される。例えば、頭蓋内へ直接穴を開けて遺伝子を導入する方法の他、側脳室への投与、あるいはクモ膜下腔への投与などが挙げられる。このうちクモ膜下腔への投与は、本発明において開示された新規かつ効率的な投与法であり、

- 5 本発明の目的、すなわち脳の血流量低下を血管新生で治療し、及び/又は脳の神経細胞死を抑制しようとする際には、クモ膜下腔への投与が好ましい。

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態（例えば液剤など）をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤（PBS等の緩

- 10 衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

- 15 また、疾患部位の周囲に遺伝子を存在し易くするために、徐放性の製剤（ミニペレット製剤等）を調製し患部近くに埋め込むことも可能であり、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。

製剤中のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、本発明のDNAとして0.0001-100mg、

- 20 好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 実験I. HGF遺伝子及びVEGF遺伝子による脳の血管新生及び血流量改善効

##### 25 果の検討

##### 材料及び実験方法

##### 1) 両側頸動脈の結紮

雄スプライン・ドゥーリーラット（350~400g; Charles River Japan、日本国厚木市）をベントバルビタールナトリウム（50mg/kg、腹腔内）で麻酔し、そし

て外科手術の間中自然呼吸させた。頸部中線切開によって、両側頸動脈を露出させ、そして2-0シルクで強く結紮した。

## 2) HVJ-リポソームコンプレックスの調製

HVJ-リポソームを調製するために使用した方法は文献  
5 (J. Clin. Invest. 93, 1458-1464(1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220(1996))  
に記載されているとおりである。簡単に述べると、ホスファチジルセリン、ホス  
ファチジルコリン及びコレステロールを1:4.8:2の重量比で混合した。この脂  
質混合物(10mg)はロータリーエバポレーター内でテトラヒドロフランを除去し  
てフラスコの側面に沈着させた。乾燥した脂質は、目的遺伝子の挿入された発現  
10 ベクターを有する200 $\mu$ lの平衡塩類溶液(BSS; 137 $\mu$ M NaCl, 5.4 $\mu$ M K  
Cl, 10 $\mu$ M トリス-HCl, pH 7.6)中で水和させた。対照群のリポソームは、  
目的遺伝子の挿入のない発現ベクターを含有している(BSS 200 $\mu$ l)。振とう  
及び超音波処理によってリポソームを調製した。

精製HVJ(Z株)は、使用直前に3分間UV照射(1秒当たり110エルグ/  
15  $\text{mm}^2$ )して不活性化した。リポソーム懸濁液(0.5ml、10mgの脂質を含有する)  
をHVJ(総容量4mlのBSS中10,000血球凝集単位)と混合した。この混合物  
を4 $^{\circ}$ Cで5分間、そしてその後静かに振とうしながら37 $^{\circ}$ Cで30分間インキューベ  
ートした。フリーのHVJはショ糖密度勾配遠心によってHVJ-リポソームから  
除去した。ショ糖勾配の頂部層を集めて使用した。プラスミドDNAの最終濃度  
20 は、以前の報告(J. Clin. Invest. 93, 1458-1464(1994)、Am. J. Physiol. 271,  
R1212-1220(1996))に従って計算したとき、20 $\mu$ g/mlと同等であった。こ  
の調製方法は、最大のトランスフェクション効率を達成するように最適化されて  
いる。

## 3) インビボ遺伝子導入

25 インビボでの効率的な遺伝子導入法を確立するために、我々はHVJ-リポソ  
ームとコンプレックスを形成したプラスミドを送達する3つの異なる方法; 1)  
内頸動脈への直接注入、2) 側脳室への注入、及び3) 大槽(クモ膜下腔)への  
注入を試験した。

内頸動脈への注入では、雄スプレーグ・ドゥーリーラット(350~400g)をベン



トバルビタールナトリウム (50mg/kg、腹腔内) で麻酔し、そして左総頸動脈まで切開してポリエチレンカテーテル (PE-50、Clay Adams、ニュージャージー州パーシッパニー) を左外頸動脈に導入した (Rakugi等)。遠位外頸動脈区域は一時的結紮糸で短時間隔離した。HVJ-リボソームコンプレックス (1  
5 ml) を外頸動脈区域に注入した。注入後注入カニューレを除去し、そして結紮糸を緩めて総頸動脈への血流を回復させた。

側脳室への注入では、麻酔したラットを定位固定枠 (Narishige Scientific Instrument Laboratory、日本国東京都) に置き、そして頭蓋を露出させた。特別に設計したテフロン連結器 (FEP管、Bioanalytical Systems、インディ  
10 アナ州ウェストラファイアット) を有するステンレス鋼カニューレ (30ゲージ; Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス) を、文献 (Am. J. Physiol. 271, R1212-1220 (1996)) に記載されているようにして左側脳室に導入した。定位固定座標は次のとおりであった。: プレクマの後ろ1.3mm、中線の側方2.1mm、及び頭蓋表面の下3.6mm。HVJ-リボソームコンプレックスを側  
15 脳室に注入した (20  $\mu$ l)。HVJ-リボソームコンプレックスを注入した後、注入カニューレを除去した。四肢の痙攣又は異常運動のような挙動変化は、注入を受けたどの動物でも観察されなかった。

クモ膜下腔への注入では、各動物の頭部を臥位に固定し、そして後頭骨頸中線切開によって環椎後頭膜を露出させた。ステンレス鋼カニューレ (27ゲージ;  
20 Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス) をクモ膜下腔に導入した。カニューレの位置を確認しそして脳内圧の上昇を回避するために100  $\mu$ lの脳脊髄液を除去した後に、HVJ-リボソーム溶液 (100  $\mu$ l: 100  $\mu$ g/ml) を大槽 (クモ膜下腔) に1分以上かけて注意深く注入した。その後、動物は30分間頭部を下にして置いた。予防的投与量の抗生物質 (30,000Uのペニシ  
25 リンG) を投与して無菌手順を完了させた。

#### 4) レーザードップラー画像化

レーザードップラーイメージャー (LDI) を使用して、手術後2週間に亘って連続的血流測定を記録した。LDIシステム (Moore Instruments Ltd.、英国デボン) には、12  $\times$  12cmの組織表面を600  $\mu$ mの深さまで連続的に走査する光

線を発生させるために2mWのヘリウムネオンレーザーが組み込まれている。走査中に、血管系を移動する血球はドップラー原理に従って投射光の振動数を変化させる。フォトダイオードは逆方向の散乱光を集めるので、元の光強度の変動は0～10Vの範囲の電圧変動に転換される。0Vの灌流出力値を0%の灌流に目盛り付けし、一方10Vを100%の灌流に目盛り付けした。走査が終了しそして逆方向の散乱光が全ての測定部位から集められると、血流分布を示す色分けされた画像がテレビモニターに表示される。灌流シグナルは6つの異なる区分に分けられ、そして各々は別個の色として表示される。血流量低下又は灌流無しは暗青色として示され、一方最大灌流は赤色として表示される。

- 10 LDIを使用して、閉塞前、直後、7日目及び14日目の脳表面の灌流を記録した。頭皮中線切開部を通して、電気ドリルで12×12mmの骨窓を作った。この骨窓上で連続的測定値が得られた。色分けされた画像が記録され、そして分析は各ラットについて灌流平均値を計算して実施した。周辺光や温度を含む変数を考慮するために、灌流計算値は後（虚血）対前（非処置）の脳の比として表した。

15 5)組織病理学的検査

- 3%のバラホルムアルデヒド、20%のショ糖溶液中で1日間固定した後に、X-gal染色用に、25μmの冠状面冷凍切片を100μmごとに作製した。切片をX-galで染色してβ-ガラクトシダーゼを発現している染色されたニューロンを同定した。アルカリホスファターゼ（ALP）染色用に、25μmの冠状面冷凍切片を100μmごとに作製した。これらの切片を0.3%の過酸化水素を含有するPBSと共にインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性を下げ、そしてその後、10%のウマ血清を有するPBS中で希釈した一次抗体又はレクチンと共に室温で60分間インキュベートした。2%のウマ血清を含有するトリス緩衝生理食塩液中で3回洗浄した後、種に適するビオチン付加二次抗体、続いてアビジン-ビオチンペルオキシダーゼコンプレックス（Vectastain ABC kit, PK 6100, Vector Laboratories、カリフォルニア州バーリンゲム）をインキュベートした。抗体結合はジアミノベンジンを使用して視覚化した。一次抗体を省略し、そしてタイプ及びクラスに適合した無関係な免疫グロブリンで染色して各抗体の陰性対照として使用した。

## 6) 脳脊髄液 (CSF) 中の HGF 及び VEGF に対する ELISA 法

- 両側頸動脈の閉塞前並びに 7 及び 14 日後のラットから得られた CSF (100  $\mu$ l) をこれらの実験用に使用した。ラット及びヒト HGF は ELISA キット (Institute of Immunology、東京都) で測定し、そしてヒト VEGF も ELISA キット (R&D systems、ミネソタ州ミネアポリス) で測定した。

## 7) 実験材料

ヒト HGF 遺伝子は、ヒトの HGF の cDNA (特許第 2777678 号) を常法によりクローニングし、これを発現ベクター p cDNA (インビトロゲン社製) に挿入したものをを用いた。

- 10 ヒト VEGF 遺伝子は、ヒト VEGF 165 の cDNA (Science 246, 1306 (1989)) を常法によりクローニングし、これを発現ベクター pUC-CAGGS に挿入したものをを用いた。

- ヒト組換え HGF は、ヒト HGF cDNA (特許第 2777678 号) を発現ベクター p cDNA (インビトロゲン社製) に挿入した組換え発現ベクターでチャイニーズハムスター卵巣細胞 (ATCC) 又は C-127 細胞 (ATCC) をトランスフェクションした後、その培養培地から常法により精製したものをを用いた。
- 15

上記の材料及び実験方法に基づき、以下の実施例 1 ~ 4 を行った。

## 実施例 1

インビボでの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のトランスフェクションにおける HV

- 20 J-リボソーム送達系の効果

導入する遺伝子として  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子 (インビトロゲン社製、HV J リボソーム中の濃度: 20  $\mu$ g/ml) を使用し、上記の材料及び実験方法の記載に従って HV J-リボソームを調製した。

- まず、HV J-リボソームコンプレックスをラットの内頸動脈に直接注入して、
- 25 脳に到達させた。しかしながら、上記頸動脈での動脈内注入では、注入後 3 及び 7 日目に脳又は微小血管内皮細胞での発現は殆ど生じなかった (データは示していない)。それ故、HV J-リボソームを側脳室及びクモ膜下腔に注入することとした。HV J-リボソーム法による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の注入はどちらも注入後 3 及び 7 日目に  $\beta$ -gal の顕著な発現を生じさせた (図 1 及び図 2)。側

脳に注入したとき、 $\beta$ -gal発現は主として側脳室及び脈絡膜叢周辺に観察された。対照的に、クモ膜下腔に注入したとき、 $\beta$ -gal発現は脳表面に観察された。以上の結果より、脳の血流量低下を血管新生で治療しようと試みるとき、クモ膜下腔への注入を使用することがより良好であることが明らかとなった。

## 5 実施例 2

### HGF及びVEGF遺伝子のインビトロランスフェクション

HGFやVEGF遺伝子の遺伝子導入の効果を知らるために、エリザ法で脳脊髄液(CSF)中でのこれら分子のタンパク質発現を測定した( $n=4$ 、各群)。最初に両側頸動脈の閉塞前、7日後及び14日後に对照ラット(HGFやVEGF  
10 遺伝子挿入のない発現ベクターで処置)のCSF中のヒトHGF及びVEGFを測定したが、これらのタンパク質の濃度は検出されなかった(図3及び図4)。

次に、HGF遺伝子(HVJリポソーム中の濃度:  $20 \mu\text{g/ml}$ )を頸動脈閉塞直後にクモ膜下腔に導入したラットのCSF中のヒトHGFタンパク質濃度を測定した。トランスフェクション後7日目に、ヒトHGFが検出されたが、ラット  
15 HGFは検出されなかった(図3)。頸動脈を閉塞されていないラット( $1.63 \pm 0.16\text{ng/ml}$ )と頸動脈を閉塞されたラット( $1.67 \pm 0.29\text{ng/ml}$ )間で顕著な差異はなかった。トランスフェクション後14日目では、ヒトHGFが( $0.40 \pm 0.04\text{ng/ml}$ )で検出された(図3)。

上記のHGF遺伝子と同様の手法により、VEGF遺伝子(HVJリポソーム  
20 中の濃度:  $20 \mu\text{g/ml}$ )をクモ膜下腔に導入したところ、CSF中のヒトVEGFの濃度はHGFよりはるかに低かった(図4)(7日目; 頸動脈を閉塞されていないラットで $18.9 \pm 2.9\text{pg/ml}$ 、頸動脈を閉塞されたラットで $16.8 \pm 5.8\text{pg/ml}$ 、14日目; 頸動脈を閉塞されていないラットで $11.7 \pm 1.6\text{pg/ml}$ 、頸動脈を閉塞されたラットで $9.9 \pm 1.5\text{pg/ml}$ )。これらの間のこの差異の理由は不明であるが、  
25 慢性の血流量低下を治療するためにはHGFを適用して血管新生を生じさせることがより良好であるように思われる。

## 実施例 3

### HGFトランスフェクションによる脳表面での血管新生

実施例2と同様の処置を施したラットの組織を用いて、CNSにおけるHGF

遺伝子導入の血管新生効果を確認した。すなわち、血管内皮細胞を検出するアルカリホスファターゼ (ALP) 染色を使用した組織病理学的分析を実施して、脳内及び周辺の内皮細胞を検出した。HGF 遺伝子導入されていないラットでは、ALP 陽性細胞は両側頸動脈の閉塞前及び7日後の脳の内部に限定されていた (図5のA、C)。興味深いことにHGF 遺伝子導入ラットでは、ALP 陽性細胞は脳表面に観察され、両側頸動脈を閉塞されていないラットより閉塞されたラットでより多く脳表面に観察された (図5のB、D)。従ってこれらの結果は、HGF 遺伝子導入によって、特に虚血状態の脳表面に血管新生が生じるものと考えられた。

#### 10 実施例4

##### LDIで測定したラットの脳血流 (CBF)

両側頸動脈閉塞前後のラットのCBFを測定した。最初に、閉塞前、直後、7日後及び14日後に遺伝子を導入されていないラットのCBFの変化を分析した。予期されたように、CBFは両側頸動脈の閉塞直後に減少し、そして時間依存的に徐々に増加した (図6)。しかしながら、CBFは非処置ラットと比較して閉塞後7及び14日目にやはり顕著により低かった (図6)。

次に、組換えHGF (200  $\mu$ g)、HGF 遺伝子 (HVJリポソーム中の濃度: 20  $\mu$ g/ml)、及び組換えHGFとHGF 遺伝子の組合せ物で処置したラットを測定した。これらHGF 遺伝子及び組換えHGFは、実施例2および3と同じくクモ膜下腔に注入した。各処置は頸動脈閉塞の10分後に実施した。組換えHGFで処置したラットでは、対照ラットと比較してCBFの顕著な増加はなかった (対照:  $886.1 \pm 99.6$ 、組換えHGF:  $985.5 \pm 142.4$ ) (図7)。しかしながら、HGF 遺伝子導入による処置では閉塞後7日目にCBFが顕著に増加した ( $1214.5 \pm 145.1$ )。更に、組換えHGFと遺伝子導入を組合せて処置したラットでは、予想外に、CBFは遺伝子導入単独の場合と比較して7日目にはるかに

20

25

より高かった ( $1490.3 \pm 197.9$ )。これらの結果より、HGF 遺伝子導入による血管新生が脳の慢性的な血流量低下を改善し、そして動脈閉塞後に処置したとき、遺伝子と組換えHGFの組合せが最も効果的であることが示された。

他方、VEGF 遺伝子導入もCBFを増加させたことから ( $1122.8 \pm 265.3$ )

(図7)、VEGF遺伝子も脳の血流量低下の改善に有用であることが明らかとなった。

- 次に、動脈閉塞前に実施したとき、この処置が有効であり得るかどうかを検討した。興味深いことに、HGF又はVEGF遺伝子で動脈閉塞前に処置すると頸
- 5 動脈閉塞によるCBFの減少を防止した(対照;  $459.4 \pm 97.4$ 、HGF;  $796.8 \pm 204$ 、VEGF;  $737.6 \pm 211.5$ )(図8)。これらの結果は、虚血前に送達されたとき、HGFとVEGF遺伝子導入が動脈閉塞による血流量低下を防止(予防)するのに有効であることを示している。

#### 実験II. HGF遺伝子による脳の神経細胞死の抑制効果の検討

##### 10 実験方法

実験に用いたヒトHGF遺伝子含有HVJ-リポソームコンプレックス及びヒト組換えHGFは、前記実験I.と同様にして調製した。

- 実験には雄性砂ネズミ(体重50g~70g)を使用した。24℃に維持された部屋で飼育し、水と食餌は自由摂取とした。この砂ネズミを以下の5つのグループに分けた。「sham」:コントロールグループ(虚血刺激なしグループ)、
- 15 「vehicle」:両側頸動脈5分間虚血グループ、「post G」:両側頸動脈5分間虚血後HGF遺伝子導入グループ、「pre G」:両側頸動脈5分間虚血前HGF遺伝子導入グループ、「post R」:両側頸動脈5分間虚血後1回リコンビナントHGF投与グループ。麻酔はフェイスマスクを用いて導入は3%ハロセンにて行い、そして1.5%ハ
- 20 ロセン、20%酸素、80%窒素の混合気で維持した。体温(直腸温)は常にモニターしながら、37度前後にヒートパッドを用いて維持した。両側頸動脈を露出後、速やかに血管クリップを用いて5分間血流を完全遮断した。その後、クリップを解除、血流を再開した。外科処置の直前または直後に、HVJリポソーム法を用いてヒトHGF遺伝子(20 $\mu$ g)をクモ膜下腔より髄液腔へ導入した。リコンビナント
- 25 HGF(30 $\mu$ g)は、外科処置直後にクモ膜下腔より髄液腔へ投与した。術後もケージを37℃に維持し、回復を待った。コントロールグループは血流遮断以外の外科処置を他のグループと同様に行った。虚血4、7日後において、脳を摘出し、切片をHE染色、TUNEL染色、免疫染色することにより、病理組織学的な解析を行った。脳脊髄液中のHGF濃度の測定は、ヒトHGF ELISAキットを用いて行った。

上記実験方法に基づき、以下の実施例 5 を行った。

#### 実施例 5

##### HGF 遺伝子トランスフェクションによる海馬CA-1領域の神経細胞死の抑制

正常砂ネズミを用いて、HVJリソソーム法による遺伝子のクモ膜下腔より髄液  
5 腔への導入の確認を行なった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入し、脳切片の  
 $\beta$ -Gal染色を行なったところ、脳の表面と海馬CA-1領域に遺伝子の発現が観察  
された（図 9）。

両側頸動脈5分間虚血により、脳の海馬CA-1領域に遅発性神経細胞死が認めら  
れた（図 10、vehicle群）。それに対しHGF遺伝子（PreGおよびPostG群）ある  
10 いはリコンビナントHGF（PostR群）の投与により、遅発性神経細胞死が有意に抑  
制された（図 11 及び図 12）。PostG群の脳脊髄液中HGF濃度をELISA法により  
測定したところ、7日後においてもHGFの発現が認められた（図 13）。よって、  
脳虚血による遅発性神経細胞死の抑制にHGFが有効であることが示された。

HGFレセプターであるc-Metの発現部位を免疫染色法で検討したところ、CA-1領  
15 域に発現が認められ、HGFのシグナルは、このc-Metを介して伝達されることが示  
された（図 14）。

さらにTUNEL法によりCA-1領域においてアポトーシスを起こした神経細胞を染  
色したところ、vehicle群で神経細胞のアポトーシスが多数確認された（図 1  
5）。それに対しHGF遺伝子投与群（PreGおよびPostG群）では、アポトーシスは  
20 ほとんど検出されなかった（図 15）。よってHGF遺伝子の投与は、神経細胞の  
アポトーシスを抑制していると考えられた。アポトーシス抑制のメカニズムを検  
討するため、アポトーシス抑制作用のあるBcl-xLおよびHSP70のCA-1領域におけ  
る発現を、免疫染色により検討した。Bcl-xLの発現を図 16 に、またHSP70の発  
現を図 17 及び図 18 に示した。両タンパクともHGF遺伝子の投与により神経細  
25 胞において発現が誘導された。以上よりHGF遺伝子の投与は、Bcl-xLやHSP70の発  
現を誘導し、神経細胞のアポトーシスを抑制していることが示された。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、HGF遺伝子及び/又はVEGF遺伝子を有効成分として含有  
する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に

投与することを特徴とする新規な投与方法などを提供することができる。



## 請求の範囲

1. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳血管障害の治療又は予防剤。
- 5 2. 脳血管障害が、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症である、請求項1記載の治療又は予防剤。
3. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血流量低下の治療又は予防剤。
- 10 4. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の血管新生促進剤。
5. HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞死の抑制剤。
6. 脳の神経細胞死が脳虚血に起因する遅発性神経細胞死である、請求項5記載の抑制剤。
- 15 7. HGF遺伝子を有効成分として含有する、脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤。
8. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパク及び／又はVEGFタンパクとの併用に供するための、請求項1～7いずれかに記載の剤。
- 20 9. HGF遺伝子を有効成分とし、且つHGFタンパクとの併用に供するための、請求項8記載の剤。
10. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子がH V Jーリボソームの形態にある、請求項1～9いずれかに記載の剤。
11. クモ膜下腔へ投与するための、請求項1～10いずれかに記載の剤。
- 25 12. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子と薬学的に許容しうる溶剤とを混合することからなる、請求項1～11のいずれかに記載の剤の製造方法。
13. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳血管障害の治療又は予防法。
14. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳

の血流量低下の治療又は予防法。

15. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の血管新生促進法。

16. HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞死の抑制法。

5 17. HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、脳の神経細胞のアポトーシス抑制法。

18. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子をクモ膜下腔へ投与する、請求項13～17のいずれかに記載の方法。

19. HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパク及び／又はVEGFタンパクを投与する、請求項13～18のいずれかに記載の方法。  
10

20. HGF遺伝子の導入と共に、HGFタンパクを投与する、請求項19記載の方法。

21. 脳血管障害の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用。  
15

22. 脳の血流量低下の治療又は予防剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用。

23. 脳の血管新生促進剤の製造のためのHGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子の使用。

20 24. 脳の神経細胞死の抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。

25. 脳の神経細胞のアポトーシス抑制剤の製造のためのHGF遺伝子の使用。

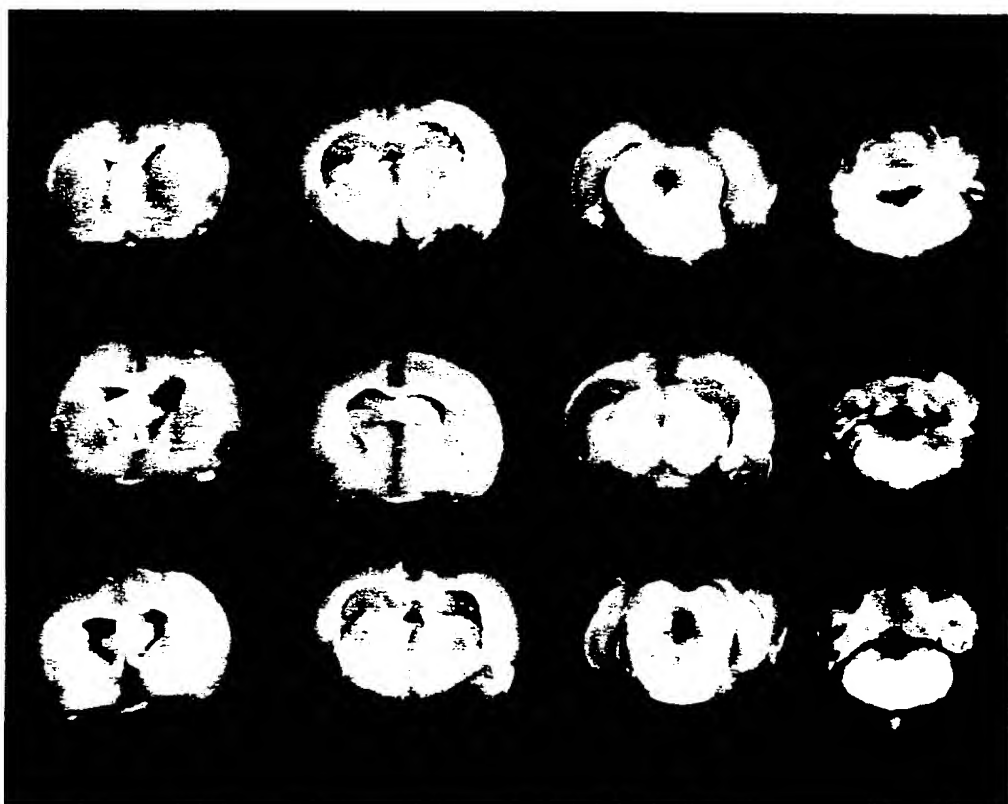
1 / 16

FIG. 1



2 / 16

FIG. 2



3 / 16

FIG. 3

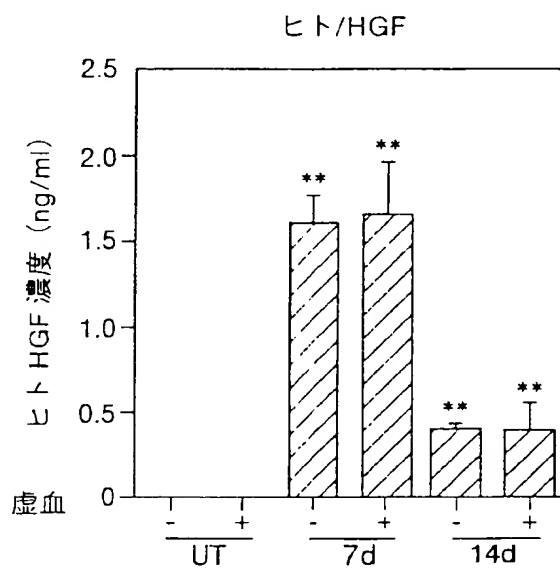
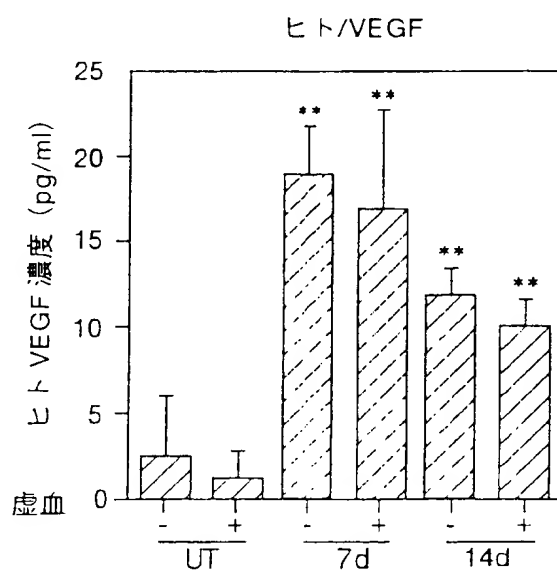
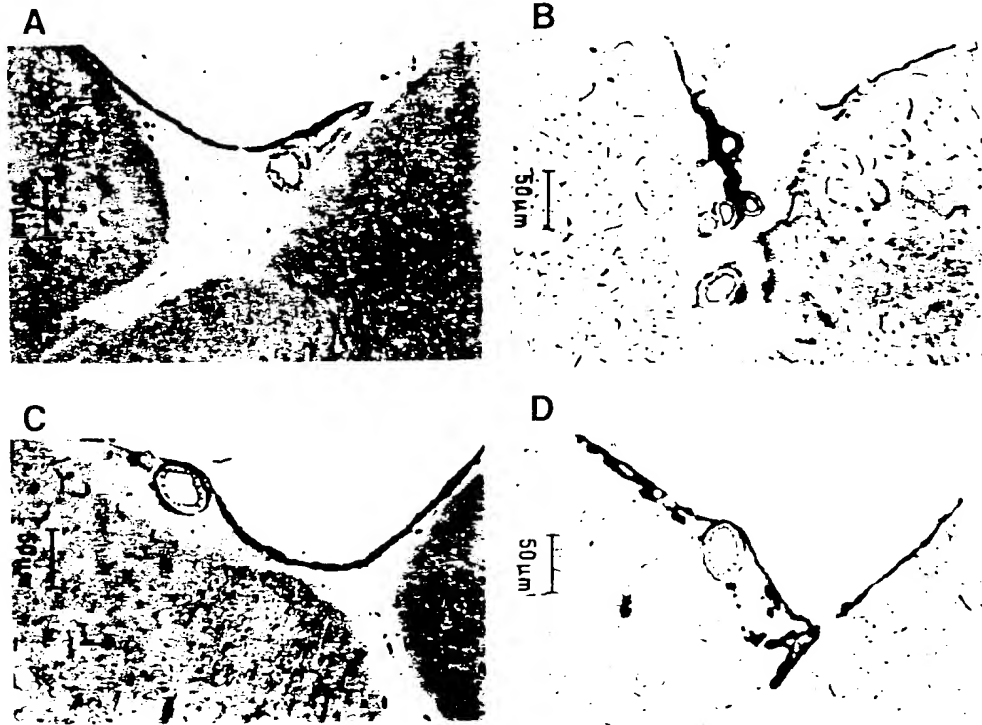


FIG. 4



4 / 16

FIG. 5



5 / 16

FIG. 6

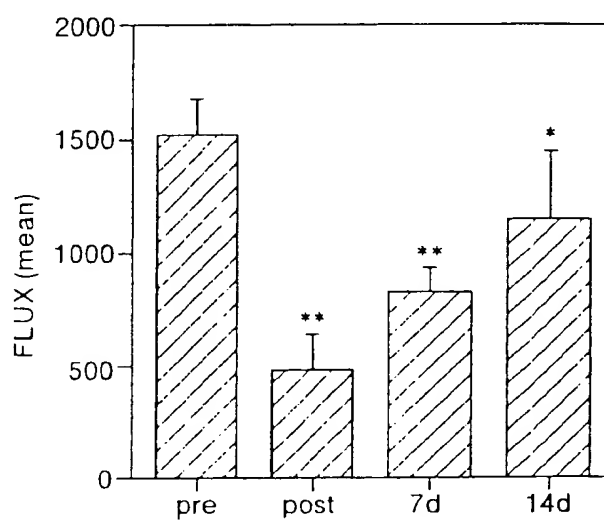
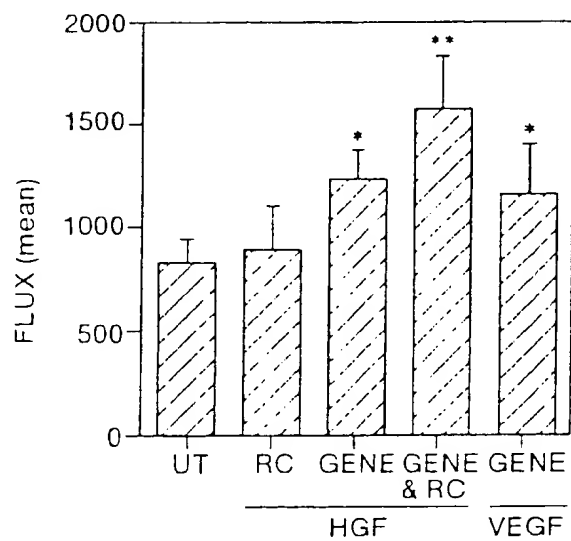
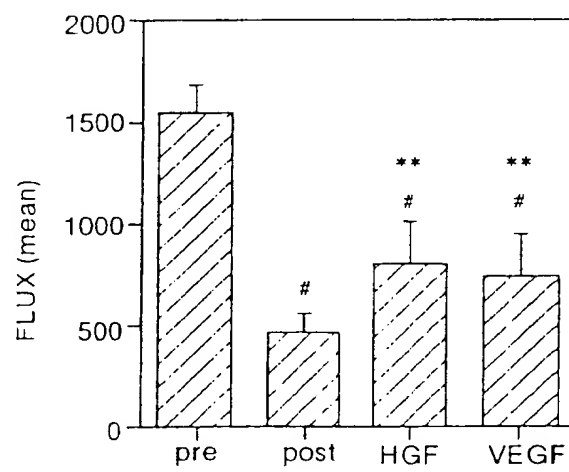


FIG. 7



6 / 16

FIG. 8





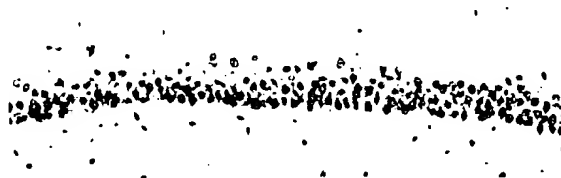
7 / 16

FIG. 9

*$\beta$ -Gal stain*

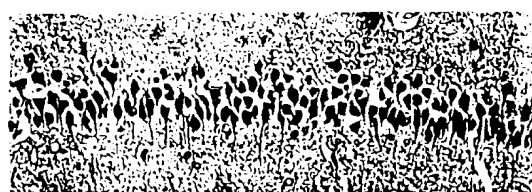


FIG. 10

*Delayed neuronal death**Sham ope. 7days**Vehicle 4days**Vehicle 7days**HE stain*

9/16

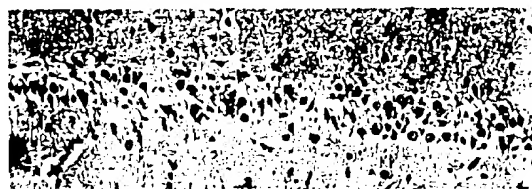
FIG. 11

*HGF injection*

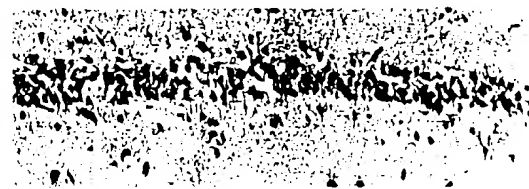
Post HGF gene 4days



Post HGF gene 7days

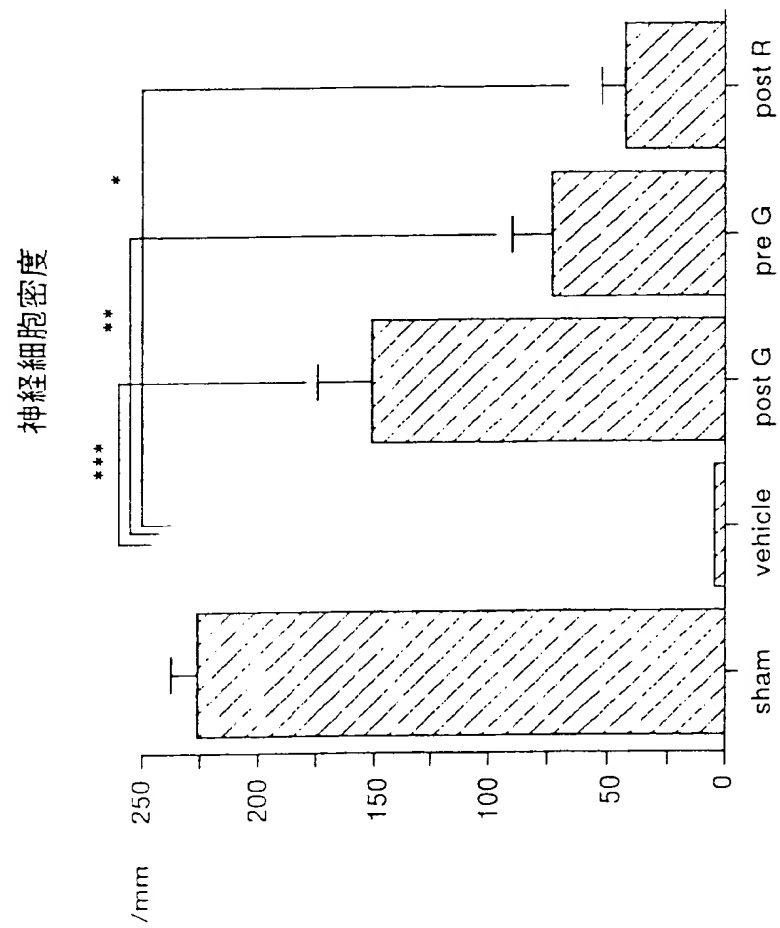


Pre HGF gene 7days

r-HGF 30  $\mu$ g 7days

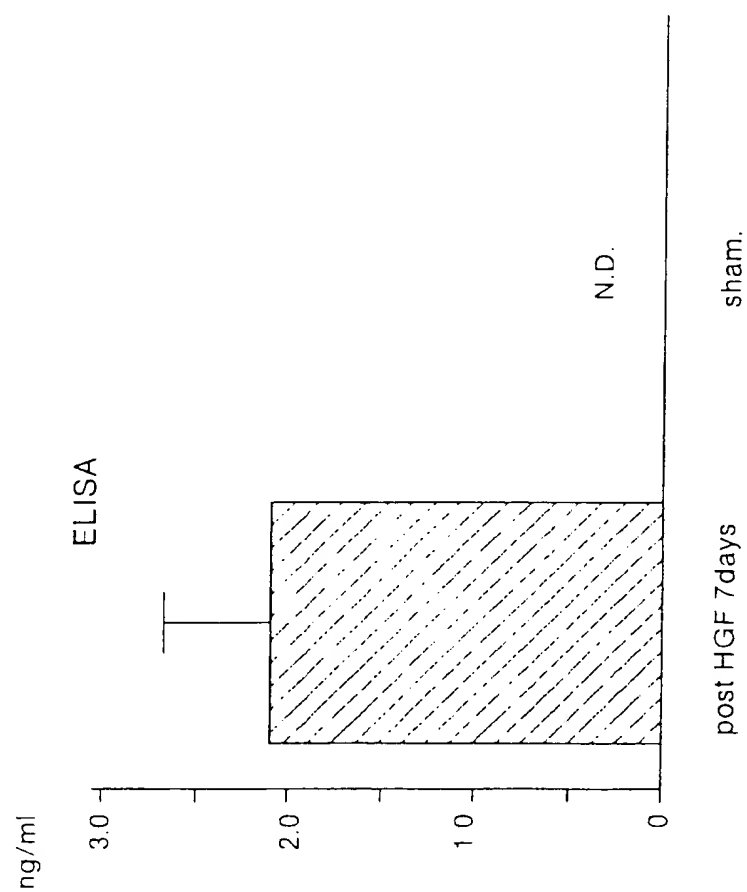
10 / 16

FIG. 12



11 / 16

FIG. 13



12 / 16

FIG. 14

*C-Met*

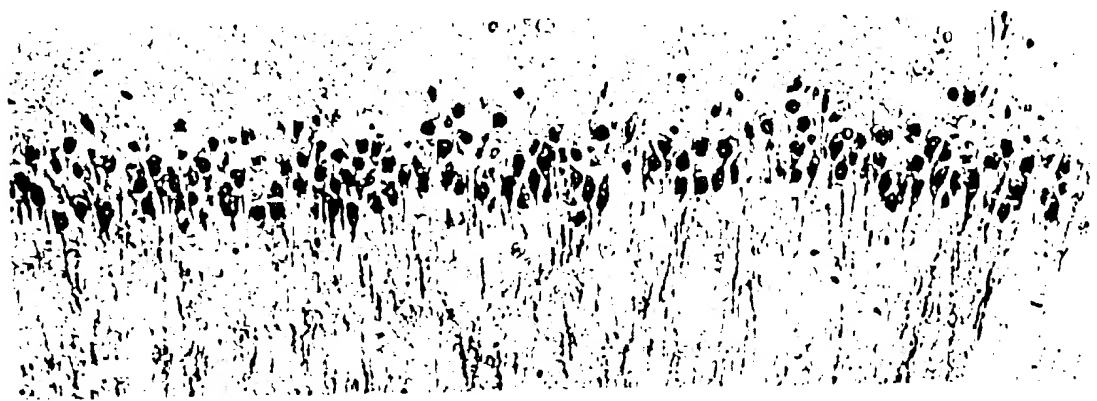


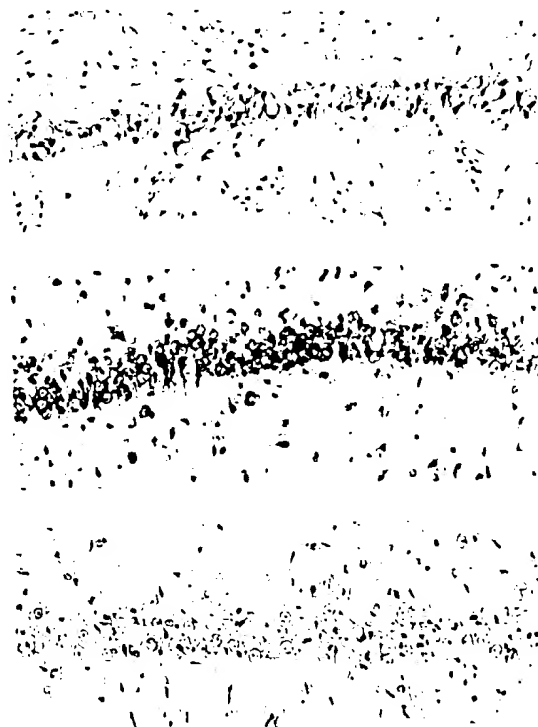
FIG. 15

*TUNEL*

*DND 7days*

*Post HGF gene 7days*

*Pre HGF gene 7days*



14 / 16

FIG. 16

*bcl-xL**sham.*

post HGF 4days



post HGF 7days

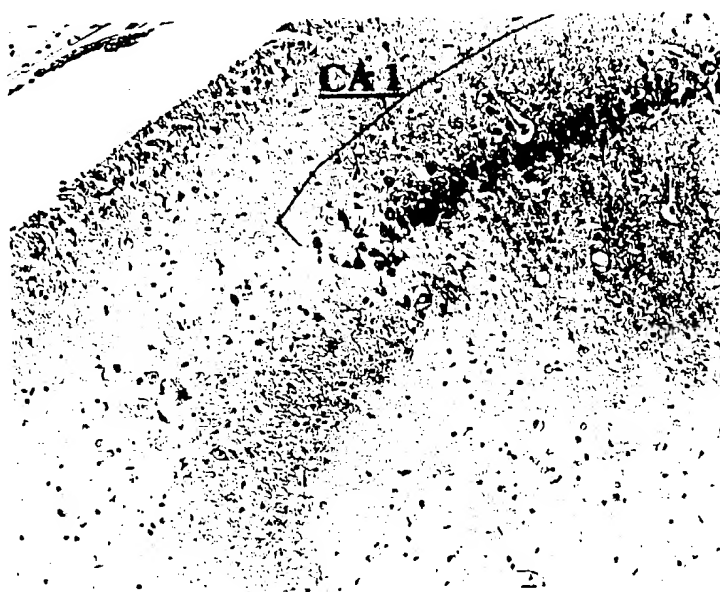




15 / 16

FIG. 17

*HSP 70*



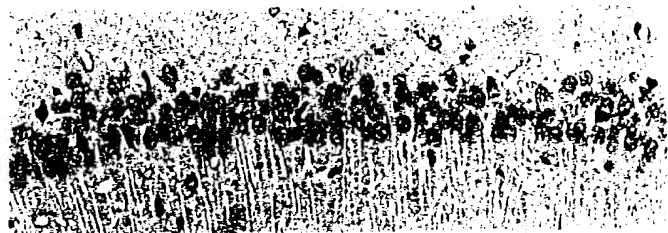
*post HGF 7days*

16 / 16

FIG. 18

*HSP70*

Sham.



Post HGF 7D



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06347

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K48/00, 38/18, A61P9/00, 9/10, 25/00, 25/28, 43/00  
//A61K35/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K48/00, 38/00-38/18, 35/76,  
A61P9/00-9/10, 25/00-25/28, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
BIOTECHABS (STN), WPIL (DIALOG), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.),	1-4, 21-23
Y	24 April, 1997 (24.04.97), Claims; summary of the invention & JP, 11-514366, A & AU, 9674548, A & EP, 883343, A1 & US, 6121246, A	5-12, 24, 25
Y	JP, 11-246434, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 14 September, 1999 (14.09.99), Claims; Par. No. [0012] (Family: none)	5-12, 24, 25
Y	JP, 7-41429, A (Mitsubishi Chemical Corporation), 10 February, 1995 (10.02.95), Claims; Par. No. [0015] (Family: none)	5-12, 24, 25
Y	JP, 8-231416, A (Mitsubishi Chemical Corporation), 10 September, 1996 (10.09.96), Claims; Par. No. [0008] (Family: none)	5-12, 24, 25
Y	EP, 722737, A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.), 24 July, 1996 (24.07.96), Claims	5-12, 24, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 December, 2000 (01.12.00)

Date of mailing of the international search report  
19 December, 2000 (19.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& WO, 95/07709, A1 & JP, 7-89869, A	
Y	WO, 97/07824, A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 06 March, 1997 (06.03.97), Claims; Prior Art, Problems to be Solved by the Invention, page 8, lines 19 to 27 & AU, 9667544, A & EP, 847757, A1 & CN, 1198675, A & NZ, 315769, A & KR, 99044279, A & AU, 200042568, A	10-12
T	MORISHITA, R., 'Adventure in Gene Therapy: "MedGene" as the First Academic Genetic Bioventure', BIOJAPAN 2000 SYMPOSIUM PROCEEDINGS, pp.183-193 (Presented on Sept.27, 2000)	1-12, 21-25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06347

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 13 to 20 pertain to methods for treatment of the human body by therapy (Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the PCT).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

In the inventions as set forth in claims 1 to 12 and 21 to 25 in the present application which is the subject of the international search, it is considered that the technical feature resides in the combination of the active ingredients with the therapeutic use. This is because it had been widely known to use nucleic acids capable of expressing angiogenic proteins (HGF, VEGF, etc.) as remedies for ischemic diseases such as cerebrovascular ischemia, as stated in the searching report.

Such being the case, it is understood that the above-described claims involve two inventions, namely, an invention wherein HGF is used as the active ingredient and another invention wherein VEGF is used as the active ingredient.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A 61 K 48/00, 38/18, A 61 P 9/00, 9/10, 25/00, 25/28, 43/00  
//A 61 K 35/76

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A 61 K 48/00, 38/00-38/18, 35/76,  
A 61 P 9/00-9/10, 25/00-25/28, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),  
BIOTECHABS (STN), WPIL (DIALOG), JICST (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.), 24. 4月. 1997 (24. 04. 97),	1-4, 21-23
Y	特許請求の範囲, 発明の要旨, & JP. 11-514366, A, & AU, 9674548, A, & EP, 883343, A1, & US, 6121246, A	5-12, 24, 25
Y	JP, 11-246434, A (住友製薬株式会社), 14. 9月. 1999 (14. 09. 99), 特許請求の範囲, 【0012】 (ファミリーなし)	5-12, 24, 25

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子 印

4 C

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 7-41429, A (三菱化学株式会社), 10. 2月. 1995 (10. 02. 95), 特許請求の範囲, 【0015】 (ファミリーなし)	5-12, 24, 25
Y	JP, 8-231416, A (三菱化学株式会社), 10. 9月. 1996 (10. 09. 96), 特許請求の範囲, 【0008】 (ファミリーなし)	5-12, 24, 25
Y	EP, 722737, A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED), 24. 7月. 1996 (24. 07. 96), 特許請求の範囲, & WO, 95/07709, A1, & JP, 7-89869, A	5-12, 24, 25
Y	WO, 97/07824, A1 (住友製薬株式会社), 6. 3月. 1997 (06. 03. 97), 特許請求の範囲, 従来技術, 発明が解決しようとする課題, 第8頁19-27行, & AU, 9667544, A, & EP, 847757, A1, & CN, 1198675, A, & NZ, 315769, A, & KR, 99044279, A, & AU, 200042568, A	10-12
T	MORISHITA, R., 'Adventure in Gene Therapy: "MedGene" as the First Academic Genetic Bioventure', BIOJAPAN 2000 SYMPOSIUM PROCEEDINGS, pp. 183-193 (Presented on Sept. 27, 2000)	1-12, 21-25

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-20 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲13ないし20にかかる発明は、治療による人体の処置方法に該当する。  
(PCT17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際調査の対象である本願の請求の範囲1-12及び21-25にかかる発明において、HGFやVEGFなどの血管形成性タンパク質を発現し得る核酸を、脳血管虚血などの虚血性疾患の治療剤として用いることは調査報告にあるように広く知られているから、技術的特徴は有効成分と治療用途の組み合わせにあるものと認められる。  
してみれば、上記請求の範囲にはHGFを有効成分とする発明とVEGFを有効成分とする発明の2の発明が包含されているものである。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



# DESCRIPTION

## GENE THERAPY FOR CEREBROVASCULAR DISORDERS

### TECHNICAL FIELD

The present invention relates to novel gene therapy agents for treating or preventing cerebrovascular disorders, and novel methods for administration of said gene therapy agents. More preferably, the present invention relates to therapeutic or preventive agents for cerebrovascular disorders comprising hepatocyte growth factor (HGF) gene and/or vascular endothelial growth factor (VEGF) gene as an active ingredient, or novel administration methods comprising administering said therapeutic or preventive agents to the subarachnoid space.

### BACKGROUND ART

Cerebral obstructive diseases, moyamoya disease and the like caused by atherosclerosis in the cerebral artery often result in chronic reduction in cerebral blood flow. This state may lead not only to the subsequent cerebral ischemic events but also to neuropathological changes including dementia (Stroke 25:1022-1027, Stroke 29:1058-1062 (1998)); Stroke 24:259-264 (1993); Ann. N. Y. Acad. Sci. 695:190-193 (1993)). However, no effective methods for improving

the reduced blood flow in these cerebrovascular disorders have been established yet. It is known that in ischemic attacks, active angiogenesis takes place specifically at the peripheral regions of the ischemia, 5 and this is involved in prolonged survival in humans (Stroke 25:1794-1798 (1994)). Thus, angiogenesis has been considered to play an important role in recovery from cerebral ischemia and prevention of future attacks.

10 The development of new blood vessels and angiogenesis are triggered concurrently with the activation of the endothelial cell. A growth factor that has been shown not only to stimulate angiogenesis in vivo, but also to be mitogenic in vitro to the 15 endothelial cell is called "angiogenic growth factor."

The therapeutic involvement of angiogenic growth factor was first described in literature by Folkman et al. (N. Eng. J. Med. 285:1182-1186 (1971)). Subsequent research confirmed that recombinant 20 angiogenic factor such as fibroblast growth factor (FGF) family (Science 257:1401-1403 (1992); Nature 362:844-846 (1993)), endothelial growth factor (J. Surg. Res. 54:575-583 (1993)), and vascular endothelial growth factor (VEGF) may be used to promote and/or 25 enhance the development of collateral circulation shunt in animal models of myocardial and hindlimb ischemia (Circulation 90:II-228-II-234 (1994)). Furthermore, the present inventors have found that HGF acts as a

endothelium-specific growth factor as does VEGF (J. Hypertens. 14:1067-1072 (1996)).

A strategy as described above that employs angiogenic growth factor to treat vascular disorders is  
5 called "therapeutic angiogenesis." More recently, the strategy has been applied to ischemic diseases in humans. However, the effectiveness of the strategy in cerebral ischemia has not been known so far.

Hepatocyte growth factor (HGF) is a  
10 pleiotropic cytokine that exhibits mitogenic, motility promoting, and morphogenic activity on a variety of cells (Nature 342:440-443 (1989)).

Effects of HGF on the brain has been reported as follows. Thus, it is known that HGF in combination  
15 with c-Met/HGF receptor of a transmembrane tyrosine kinase is expressed at various regions in the brain, and the operative linkage of HGF and c-Met enhances the survival of neurons in the primary culture of hippocampus, and induces neurite elongation in the  
20 development in vitro of neurons (J. Cell. Biol. 126:485-494 (1994); Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 7-89869). Recently, it has been reported that HGF is induced in neurons in ischemia (Brain Res. 799:311-316 (1998)), that  
25 recombinant HGF has a neuroprotective effect on delayed neuronal death after ischemia in the hippocampus, and that the continuous injection of recombinant HGF into the brain was effective in reducing the size of

infarction (J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:345-348 (1998)). These findings suggest that HGF acts as an important neurotrophic factor in cerebral ischemia.

On the other hand, vascular endothelial growth factor (VEGF) is a dimeric glycoprotein mitogenic to the endothelial cell and has an ability of enhancing vascular permeability. VEGF has a direct and specific mitogenic effect on the endothelial cell (Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851-858 (1989)).

10 The binding sites of VEGF including tyrosine kinase receptor Flt, Flk-1, and KDR occur on the endothelial cell but not on other cell types, thereby limiting the effect of VEGF to the endothelial cell.

With respect to the effect of VEGF on the brain, it has been reported that VEGF in the central nervous system is rapidly induced by ischemic disorders in the brain (Mol. Cell. Biol., 16:4604-4613 (1996)), and that the administration of recombinant VEGF to the brain surface effectively reduced the amount of

15 infarction (J. Cereb. Blood Flow Metab. 18:887-895 (1998)). Details thereof has not been known, however.

In another aspect, in addition to the above-mentioned actions of HGF and VEGF, these factors are potent angiogenic growth factors as mentioned above (J. Cell. Biol. 119:629-641 (1992)); Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851-858 (1989)). Ischemic attacks are

25 known to give rise to active angiogenesis in the periphery of ischemia, which is related to prolonged

survival of humans (Stroke 25:1794-1798 (1994)). Thus, angiogenesis is thought to play an important role in recovery from cerebral ischemia and in prevention of future attacks. However, it is not known whether

5 therapeutic angiogenesis using recombinant HGF or VEGF is actually feasible for cerebral ischemia etc. Furthermore, recombinant angiogenic growth factors rapidly disappear from the brain and thus require continuous injection into the brain, which procedure is

10 rather dangerous and impractical in the clinical settings. Thus, it would be reasonable if the technique of gene introduction is used to express and secrete angiogenic growth factors in ischemic brain and its periphery on a continual basis. There are no

15 examples so far in which HGF gene or VEGF gene has been applied (gene therapy) to ischemic disorders in the brain, and possibly because of its unique feature of the brain tissue, there are no suggestions made on the applicability thereof.

## 20 DISCLOSURE OF THE INVENTION

The present invention relates to novel gene therapy agents for treating or preventing cerebrovascular disorders, and novel methods for administration of said gene therapy agents. More

25 preferably, the present invention relates to novel agents for treating and preventing cerebrovascular disorders comprising hepatocyte growth factor (HGF)

gene and/or vascular endothelial growth factor (VEGF) gene as an active ingredient, or novel administration methods comprising administering said therapeutic or preventive agents to the subarachnoid space.

5           The present inventors investigated in vivo whether the introduction of HGF gene and VEGF gene can induce angiogenesis on the surface of an ischemic brain. As a result, we have revealed that: (a) after the transfection of HGF gene or VEGF gene, these  
10 proteins are detected in the brain over a prolonged period of time, (b) therapy with HGF gene or VEGF gene transfection can induce angiogenesis on the surface of an ischemic brain, (c) the transfection of HGF gene or VEGF gene is effective in treating reduced blood flow  
15 in the brain caused by vascular obstruction, and (d) the therapy is also useful when performed before obstruction. Furthermore, we have also demonstrated that the introduction of these genes can be more effectively attained by a novel method of  
20 administration i.e., introduction into subarachnoid space.

          In addition, the present inventors have found that delayed neuronal death due to ischemia in the hippocampus CA-1 region can be suppressed by the  
25 introduction of HGF gene.

          Based on the foregoing findings, the present invention was completed.

          Thus, the present invention provides the

inventions described in the following (1) to (23).

(1) A therapeutic and preventive agent for cerebrovascular disorders comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient;

5           (2) The therapeutic or preventive agent in the above (1) wherein cerebrovascular disorders are cerebrovascular obstruction, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, stroke, cerebral bleeding, moyamoya disease, cerebrovascular  
10 dementia, Alzheimer's dementia, and sequelae of cerebral bleeding or cerebral infarction;

(3) A therapeutic or preventive agent for reduced blood flow in the brain comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient;

15           (4) A promoting agent for angiogenesis in the brain comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient;

(5) A suppressing agent for neuronal death in the brain comprising HGF gene as an active ingredient;

20           (6) The suppressing agent of the above (5) wherein neuronal death in the brain is delayed neuronal death caused by cerebral ischemia;

(7) A suppressing agent for apoptosis of nerve cells in the brain comprising HGF gene as an  
25 active ingredient;

(8) The agent in any of the above (1)-(7) which comprises HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient and which is to be used in combination with

HGF protein and/or VEGF protein;

(9) The agent of the above (8) which comprises HGF gene as an active ingredient and which is to be used in combination with HGF protein;

5 (10) The agent in any of the above (1)-(9) wherein HGF gene and/or VEGF gene are in the form of HVJ-liposome;

(11) The agent in any of the above (1)-(10) to be administered into the subarachnoid space;

10 (12) A method of producing the agent in any of the above (1)-(11) comprising blending HGF gene and/or VEGF gene with a pharmaceutically acceptable solvent;

(13) A therapeutic or preventive method for  
15 cerebrovascular disorders comprising introducing HGF gene and/or VEGF gene into humans;

(14) A therapeutic or preventive method for reduced blood flow comprising introducing HGF gene and/or VEGF gene into humans;

20 (15) A method of promoting cerebral angiogenesis comprising introducing HGF gene and/or VEGF gene into humans;

(16) A method of suppressing neuronal death in the brain comprising introducing HGF gene into  
25 humans;

(17) A method of suppressing apoptosis of nerve cells in the brain comprising introducing HGF gene into humans;



(18) The method in any of the above (13)-(17) comprising administering HGF gene and/or VEGF gene into the subarachnoid space in humans;

(19) The method in any of the above (13)-(18)  
5 comprising administering HGF protein and/or VEGF protein together with the introduction of HGF gene and/or VEGF gene;

(20) The method in the above (19) comprising administering HGF protein together with the  
10 introduction of HGF gene;

(21) Use of HGF gene and/or VEGF gene in the manufacture of a therapeutic or preventive agent for cerebrovascular disorders;

(22) Use of HGF gene and/or VEGF gene in the  
15 manufacture of a therapeutic or preventive agent for reduced blood flow in the brain;

(23) Use of HGF gene and/or VEGF gene in the manufacture of a promoting agent for angiogenesis in the brain;

20 (24) Use of HGF gene in the manufacture of a suppressing agent for neuronal death in the brain; and

(25) Use of HGF gene in the manufacture of a suppressing agent for apoptosis of nerve cells in the brain.

#### 25 BRIEF EXPLANATION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a photograph of morphology of an organism exhibiting the expression of  $\beta$ -gal ( $\beta$ -

galactosidase) on the brain surface. Bottom, the injection of HVJ-liposome (1 ml) into the internal carotid artery; middle, the injection of HVJ-liposome (100  $\mu$ l) into the cisterna (subarachnoid space); upper, 5 the injection of HVJ-liposome (20  $\mu$ l) into the lateral ventricle. n=4 for each group.

Fig. 2 is a photograph of morphology of an organism exhibiting the expression of  $\beta$ -gal ( $\beta$ -galactosidase) in the brain. Left, the injection into 10 the internal carotid artery; middle, the injection into the lateral ventricle; right, injection into the cisterna (subarachnoid space).

Fig. 3 is a graph showing the in vivo expression of human HGF protein in the rat 15 cerebrospinal fluid by an ELISA method. In the figure, UT represents the rats treated with an expression vector containing no HGF gene, 7d represents the rats on day 7 after the introduction of HGF gene, and 14d represents the rats on day 14 after the introduction of 20 HGF gene. In the figure also, - represents the absence of obstruction, and + represents the presence of obstruction in the carotid artery. The ordinate represents the concentration of HGF (ng/ml). \*\*:  $P < 0.01$  for UT. n=4 for each group.

25 Fig. 4 is a graph showing the in vivo expression of human VEGF protein in the rat cerebrospinal fluid by an ELISA method. In the figure, UT represents the rats treated with an expression

vector containing no VEGF gene, 7d represents the rats on day 7 after the introduction of VEGF gene, and 14d represents the rats on day 14 after the introduction of VEGF gene. In the figure also, - represents absence of obstruction in the carotid artery, and + represents the presence of obstruction. The ordinate represent the concentration of VEGF (pg/ml). \*\*:  $P < 0.01$  for UT.  $n = 4$  for each group.

Fig. 5 is a microphotograph showing the result of cytohistochemical staining of the endothelial cell in the brain and in its periphery before and 7 days after the transfection of HGF gene. A (upper left), a brain transfected with a vector (expression vector containing no HGF gene) without obstructing the carotid artery; B (upper right), a brain transfected with HGF gene without obstructing the carotid artery; C (bottom left), a brain transfected with a vector on day 7 after the obstruction of the carotid artery; D (bottom right), a brain transfected with HGF gene on day 7 after the obstruction of the carotid artery.  $n = 4$  for each group.

Fig. 6 is a graph showing changes in cerebral blood flow with time measured by a laser Doppler imager (LDI). In the figure, pre represents before obstruction, post represents after the obstruction of the carotid artery, 7d represents 7 days after obstruction, and 14d represents 14 days after obstruction. The ordinate (FLUX) represents an mean

cerebral perfusion. Relative to pre, \* $P < 0.05$ ,  
\*\* $P < 0.01$ .  $n=6$  for each group.

Fig. 7 is a graph showing CBF measured by LDI  
on day 7 after the obstruction of the carotid artery.  
5 In the figure, UP represents the rats treated with an  
expression vector, RC represents the rats treated with  
recombinant HGF (200  $\mu\text{g}$ ), GENE represents the rats  
treated with HGF gene (10  $\mu\text{g}$ ), GENE&RC represents the  
rats treated with recombinant HGF (200  $\mu\text{g}$ ) and HGF gene  
10 (10  $\mu\text{g}$ ), and GENE in VEGF represents the result of the  
rats treated with VEGF gene (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The ordinate  
(FLUX) is an mean cerebral perfusion. Relative to pre,  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .  $n=6$  for each group.

Fig. 8 is a graph showing CBF measured by LDI  
15 before and immediately after the obstruction of the  
carotid artery. In the figure, pre represents before  
the obstruction of the carotid artery of the control  
rats, post represents immediately after the obstruction  
of the carotid artery, HGF represents the result of the  
20 rats immediately after carotid artery obstruction that  
were subjected to HGF transfection 7 days before  
arterial obstruction, and VEGF represents the result of  
the rats immediately after carotid artery obstruction  
that were subjected to VEGF transfection 7 days before  
25 arterial obstruction. Relative to post, \*\* $P < 0.01$ .  $n=5$   
for each group.

Fig. 9 is a microphotograph showing the  
expression of  $\beta$ -gal ( $\beta$ -galactosidase) on the brain

surface (brain surface in the figure) and in the hippocampus CA-1 region (CA1 in the figure).

Fig. 10 is a microphotograph showing the result in which delayed neuronal death was observed in the hippocampus CA-1 region by ischemic stimulation of the bilateral carotid arteries. In the figure, Sham ope. 7 days represents the result on day 7 of the control (surgically treatment only without ischemic stimulation), and Vehicle (4 days, 7 days) represents the result on day 4 and 7 after ischemia of the bilateral carotid arteries, respectively.

Fig. 11 is a microphotograph showing the result in which delayed neuronal death in the hippocampus CA-1 region was suppressed by the introduction Of HGF gene or recombinant HGF protein before and after ischemic stimulation of the bilateral carotid arteries. In the figure, Post HGF gene (4 days, 7 days) represents the result on day 4 and day 7 in which HGF gene was introduced immediately after ischemia of the bilateral carotid arteries, Pre HGF gene 7 days represents the result on day 7 in which HGF gene was introduced immediately before ischemia of the bilateral carotid arteries, and r-HGF 7 days represents the result on day 7 in which recombinant HGF protein was introduced immediately after ischemia of the bilateral carotid arteries.

Fig. 12 is a graph showing the result in which the density of nerve cells in the hippocampus CA-

1 region was measured by staining the live nerve cells.  
In the figure, the ordinate represents the cell density  
(live nerve cell count/mm). Sham in the abscissa  
represents the result of the control (no ischemic  
5 stimulation), vehicle represents the result of ischemia  
of the bilateral carotid arteries, PostG represents the  
result in which HGF gene was introduced immediately  
after ischemia of the bilateral carotid arteries, PreG  
represents the result in which HGF gene was introduced  
10 before ischemia of the bilateral carotid arteries, and  
PostR represents the result in which recombinant HGF  
protein was introduced after ischemia of the bilateral  
carotid arteries. Relative to vehicle, \* $P < 0.05$ ,  
\*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

15 Fig. 13 is a graph showing the result in  
which HGF gene was introduced after ischemia of the  
bilateral carotid arteries and then the protein  
concentration of HGF in the cerebrospinal fluid 7 days  
later was measured by an ELISA method. In the figure,  
20 the ordinate represents the protein concentration  
(ng/ml) of HGF, post HGF on the abscissa represents the  
result of introduction of HGF gene, and sham represents  
the result of the control (no ischemic stimulation).  
N.D. represents the result not detected.

25 Fig. 14 is a microphotograph showing the  
result in which the expression of C-Met in the  
hippocampus CA-1 region was analyzed by an  
immunostaining method.

Fig. 15 is a microphotograph showing the result in which the nerve cells that had apoptosis in the hippocampus CA-1 region were stained by the TUNEL method. In the figure, DND 7 days represents the nerve cells that had delayed neuronal death on day 7 after ischemia of the bilateral carotid arteries, Post HGF gene 7 days represents the result on day 7 after HGF gene was introduced immediately after ischemia of the bilateral carotid arteries, and Pre HGF gene 7 days represents the result on day 7 after HGF gene was introduced immediately before ischemia of the bilateral carotid arteries.

Fig. 16 is a microphotograph showing the result in which the expression of Bcl-xL in the hippocampus CA-1 region was analyzed by an immunostaining method. In the figure, sham. represents the result of the control (no ischemic stimulation), post HGF (4 days, 7 days) represents the result on day 4 and day 7 after HGF gene was introduced immediately after ischemia of the bilateral carotid arteries.

Fig. 17 is a microphotograph showing the result in which HSP70 expression in the hippocampus CA-1 region on day 7 after the introduction of HGF gene immediately after ischemia of the bilateral carotid arteries was analyzed by an immunostaining method.

Fig. 18 is a microphotograph showing the result in which HSP70 expression in the hippocampus CA-1 region was analyzed by an immunostaining method. In

the figure, Sham. represents the result of the control (no ischemic stimulation), and Post HGF 7D represents the result on day 7 after the introduction of HGF gene immediately after ischemia of the bilateral carotid  
5 arteries.

#### BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

As used herein "HGF gene" means a gene that can express HGF (HGF protein). Specifically, there can be mentioned one in which cDNA of HGF as described in  
10 Nature 342:440 (1989); Patent Publication No., 2777678; Biochem. Biophys. Res. Commun. 163:967 (1989); and Biochem. Biophys. Res. Commun. 172:321 (1990) was integrated into a suitable expression vector (nonviral vector, viral vector) as described below. The base  
15 sequence of cDNA encoding HGF has been described in the above literature and also been registered at databases such as Genbank. Thus, based on such sequence information, a suitable DNA portion is used as a PCR primer; for example, by performing a RT-PCR reaction on  
20 mRNA derived from the liver or leukocytes, cDNA of HGF can be cloned. Such cloning can easily be performed by a person skilled in the art according to a basic textbook such as Molecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

25 Furthermore, the HGF gene of the present invention is not limited to those described above, but any gene may be used as the HGF gene of the present



invention as long as the protein expressed by said gene can act in virtually the same manner as HGF. Thus, from among 1) DNA that hybridizes to said cDNA under a stringent condition and 2) DNA encoding a protein comprising an amino acid sequence in which one or a plurality of (preferably several) amino acids have been substituted in, deleted from, and/or added to the amino acid sequence of the protein encoded by said cDNA and the like, those that encode a protein having an action as HGF are encompassed in the category of HGF gene of the present invention. DNA in the above 1) and 2) may be easily obtained by site-directed mutagenesis, a PCR method, or a standard hybridization method and the like, and specifically they may be performed with reference to a basic textbook such as the above Molecular Cloning etc.

As used herein "VEGF gene" means a gene that can express VEGF (VEGF protein). Thus, there can be illustrated one integrated into a suitable expression vector (nonviral vector, viral vector) as described below. By selective splicing of VEGF gene at transcription in humans, the presence of 4 subtypes (VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206) have been reported (Science 219:983 (1983); J. Clin. Invest. 84:1470 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851 (1989)). According to the present invention, any of these VEGF genes can be used, but from the viewpoint of being biologically most potent, VEGF165 gene is most

preferred. Furthermore, as in the case of the above HGF, modified versions of these VEGF genes are encompassed in the category of the VEGF gene of the present invention as long as they encode a protein  
5 having an activity as VEGF.

Said VEGF gene, as in the case of HGF gene, may be easily cloned by a person skilled in the art based on sequences as previously described (for example, Science 246:1306 (1989)) and sequence  
10 information registered in databases, and their modification can also be easily performed.

According to the present invention, it was demonstrated for the first time that cerebrovascular disorders can be treated or prevented with HGF gene or  
15 VEGF gene. Thus, the present invention revealed, for the first time, that (a) after the transfection of HGF gene or VEGF gene, these proteins are detected in the brain over a prolonged period of time, (b) by treatment using HGF gene or VEGF gene transfection, angiogenesis  
20 can be induced on the surface of an ischemic brain, (c) the transfection of HGF gene or VEGF gene is effective in treating reduced blood flow in the brain caused by obstruction in the blood vessels, and (d) this treatment method is also effective when performed  
25 before obstruction. Thus, HGF gene and VEGF gene may be effectively used as a therapeutic or preventive agent for various cerebrovascular disorders such as disorders resulting from cerebral ischemia, disorders

associated with reduced blood flow in the brain, disorders for which improvement is expected by promoting angiogenesis in the brain, and the like.

Specifically they are effectively used as  
5 therapeutic or preventive agents (hereinafter, the therapeutic or preventive agents of the present invention are simply designated as gene therapy agents) for cerebrovascular obstruction, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, stroke  
10 (including subarachnoid bleeding, transient cerebral ischemia, cerebral atherosclerosis), cerebral bleeding, moyamoya disease, cerebrovascular dementia, Alzheimer's dementia, sequelae of cerebral bleeding or cerebral infarction, and the like.

15 Furthermore, the present inventors have found that delayed neuronal death due to ischemia in the hippocampus CA-1 region is suppressed by the introduction of HGF gene, that is, HGF gene has an effect of suppressing neuronal death in the brain. We  
20 have also demonstrated that this effect is based on the c-Met-mediated apoptosis-suppressing effect of nerve cells.

The hippocampus CA-1 region as used herein is a region that is densely populated with nerves and a  
25 region that is susceptible to neuronal death by cerebral ischemia. Such HGF gene has been found to be able to treat and prevent cerebrovascular disorders based on the both of the angiogenic effect (suppression

of reduced blood flow) and the nerve cell protective effect.

Since HGF gene has c-Met-mediated nerve cell protecting effect as described above, it can be  
5 effectively used as a therapeutic or preventive agent for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Alzheimer's senile dementia, amyotrophic lateral sclerosis, or Parkinson's disease.

In accordance with the present invention, HGF  
10 gene and VEGF gene may be used alone or in combination with each other. They can also be used in combination with the gene of other vascular endothelial growth factors. Furthermore, HGF gene and/or VEGF gene may be used in combination with HGF protein and/or VEGF  
15 protein. Preferred are a combination of HGF gene and HGF protein or of VEGF gene and VEGF protein, more preferably of HGF gene and HGF protein. See Example 4 below for details.

HGF protein as used herein may be obtained by  
20 any method as long as it has been purified to the extent it may be usable as a pharmaceutical drug. Commercially available products (for example Toyoboseki k.k., Code No. HGF-101, etc.) may also be used. cDNA of HGF obtained by cloning mentioned above is inserted  
25 into any suitable expression vector, which is introduced into a host cell to obtain a transformant, from the culture supernatant of which transformant may be obtained recombinant HGF protein of interest (see,

for example, Nature 342:440 (1989); Patent Publication No. 2777678). VEGF protein can also be obtained in a similar manner.

Then, a method of gene introduction, form of  
5 introduction, amount to be introduced and the like for use in gene therapy of the present invention are explained.

When a gene therapy agent comprising the above gene as an active ingredient is to be  
10 administered to patients, the dosage regimens are roughly divided into two: a case in which a nonviral vector is used, and a case in which a viral vector is used. The methods of preparation and administration thereof are explained in detail in experimental manuals  
15 (Separate volume of Experimental Medicine, Basic Technology in gene therapy, Yodosha (1996); Separate volume of Experimental Medicine, Experimental Methods in Gene Introduction and Expression Analysis, Yodosha (1997); Handbook for Development and Research of Gene  
20 Therapy, edited by Japan Society of Gene Therapy, NTS (1999)). This will be explained in specific terms below.

A. When a nonviral vector is used

Using a recombinant expression vector in  
25 which a gene of interest has been integrated into a commonly used gene expression vector may be used to introduce the gene of interest into cells or tissue by the following method etc.

As a method of gene introduction into cells, there can be mentioned the lipofection method, the calcium phosphate co-precipitation method, the DEAE-dextran method, direct DNA introduction methods using 5 micro glass tubes, and the like.

As a method of gene introduction into the tissue, a recombinant expression vector may be incorporated into the cell by subjecting any of a method of gene introduction with internal type 10 liposome, a method of gene introduction with electrostatic type liposome, the HVJ-liposome method, the improved HVJ-liposome method (HVJ-AVE liposome method), the receptor-mediated gene introduction method, a method of introducing DNA molecules together 15 with carriers (metal particles) by a particle gun, a method of directly introducing naked-DNA, a method of introduction with positively-charged polymers and the like.

Among them, HVJ-liposome is a fusion product 20 prepared by enclosing DNA into liposome made of lipid bilayer, which was fused to inactivated Sendai virus (Hemagglutinating virus of Japan: HVJ). The HVJ-liposome method is characterized by a very high fusing activity with the cell membrane compared to the 25 conventional liposome method, and is a preferred mode of introduction. For the method of preparing HVJ-liposome, see, for details, the literature (Separate volume of Experimental Medicine, Basic Technology in

gene therapy, Yodosha (1996); Experimental Methods in Gene Introduction and Expression Analysis, Yodosha (1997); J. Clin. Invest. 93:1458-1464 (1994); Am. J. Physiol. 271:R1212-1220 (1996)) and the like, and  
5 experimental examples described below for details. As HVJ, the Z strain (available from ATCC) is preferred, but other HVJ strains (for example, ATCC VR-907 and ATCC VR-105) may also be used.

Furthermore, the method of directly  
10 introducing naked-DNA is the most simple method among the methods described above, and in this regard a preferred method of introduction.

Expression vectors as used herein may be any expression vectors as long as they permit the  
15 expression in vivo of the gene of interest, and include, for example, expression vectors such as pCAGGS (Gene 108:193-200 (1991)), pBK-CMV, pCDNA3.1, pZeoSV (Invitrogen, Stratagene) and the like.

B. When a viral vector is used

20 Representative methods use, as viral vectors such as recombinant adenovirus, retrovirus and the like. More specifically, the gene of interest can be introduced into DNA virus or RNA virus such as detoxified retrovirus, adenovirus, adeno-associated  
25 virus, herpesvirus, vaccinia virus, poxvirus, poliovirus, Sindbis virus, Sendai virus, SV40, human immunodeficiency virus (HIV) and the like, which is then infected to the cell to introduce the gene into

the cell.

Among the above viral vectors, the efficiency of infection is known to be the highest with adenovirus than with other viral vectors. In this regard, it is  
5 preferred to use an adenovirus vector system.

As methods of introducing a gene therapy agent into a patient, there are an in vivo method that permits direct introduction of the gene therapy agent into the body, and an ex vivo method in which certain  
10 cells are removed from a human and a gene therapy agent is introduced into said cells, which are then returned into the body (Nikkei Science, April 1994 issue pp. 20-24; Monthly Yakuji, 36(1):23-48 (1994); Supplement to Experimental Medicine 12(15) (1994); Handbook for  
15 Development and Research of Gene Therapy, edited by Japan Society of Gene Therapy, NTS (1999)). According to the present invention, the in vivo method is preferred.

Sites for administration to patients are  
20 selected depending on the disease, disease state and the like to be treated. For example, in addition to making a hole directly into the cranium and introducing the gene therethrough, there is administration to the lateral ventricle or administration to the subarachnoid  
25 space. Among them, administration to the subarachnoid space is a novel and efficient method of administration that was disclosed in the present invention. The administration to the subarachnoid space is desired



when it is intended to treat the disease based on the original purpose, i.e. when reduced blood flow in the brain is treated by angiogenesis and/or by suppressing neuronal death in the brain.

5                Dosage forms may take various forms according to various administration regimens described above (for example, liquids). When, for example, an injection containing the gene as an active ingredient is to be used, said injection may be prepared according to a  
10 standard method. For example, after dissolving in a suitable solvent (a buffer such as PBS, physiological saline, sterile water, etc.), it is filter-sterilized with filter as needed, and then filled into sterilized containers. Commonly used carriers etc. may be added  
15 to the injection. In liposomes such as HVJ-liposome, they may take the form of suspensions, frozen formulations, centrifugation-concentrated frozen formulations and the like.

                 In order to facilitate delivery of the gene  
20 into the periphery of a lesion site, a sustained release preparation (minipellet formulation, etc.) may be prepared and implanted near the affected region, or it can be administered to the affected area continuously and gradually using an osmotic pump etc.

25                The content of DNA in the formulation may be controlled as appropriate depending on the disease to be treated, age and weight of the patient, etc., and usually it is in the range of 0.0001-100 mg, preferably

0.001-10 mg, as the DNA of the present invention, which is preferably given every few days to every few months.

The present invention will now be specifically explained with reference to the following 5 examples. It should be noted, however, that the present invention is not limited by these examples in any way.

#### Experiment I.

A study on angiogenesis and effect of  
10 improving blood flow in the brain with HGF gene and  
VEGF gene

#### Materials and experimental methods

##### 1) Ligation of the bilateral carotid arteries

Male Sprague Dawley rats (350-400 g; Charles  
15 River Japan, Atsugi city, Japan) were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, intraperitoneal), and were allowed to breathe spontaneously during surgery. By midline neck incision, the bilateral carotid arteries were exposed, and were tightly ligated by 2-0  
20 silk.

##### 2) Preparation of HVJ-liposome complex

The method used to prepare HVJ-liposome is as previously described (J. Clin. Invest. 93:1458-1464 (1994); Am. J. Physiol. 271:R1212-1220 (1996)).  
25 Briefly, phosphatidyl serine, phosphatidyl choline, and cholesterol were mixed at a weight ratio of 1:4.8:2. Tetrahydrofuran was removed by rotary evaporator to

allow the lipid mixture (10 mg) to deposit on the side wall of the flask. The dried lipid was hydrated in 200  $\mu$ l of a balanced salt solution (BSS: 137  $\mu$ M NaCl, 5.4  $\mu$ M KCl, 10  $\mu$ M Tris-HCl, pH 7.6) having an expression

5 vector in which the gene of interest had been inserted. Liposomes in the control group contain an expression vector having no gene of interest (BSS 200  $\mu$ l).

Liposomes were prepared by shaking and ultrasonication.

Purified HVJ (Z strain) was inactivated by UV  
10 irradiation (110 erg/mm<sup>2</sup> per second) for 3 minutes immediately prior to use. A liposome mixture (0.5 ml containing 10 mg of lipid) was mixed with HVJ (10,000 hemagglutination units in a total volume of 4 ml). The mixture was incubated at 4°C for 5 minutes, and then at  
15 37°C for 30 minutes while shaking gently. Free HVJ was removed from the HVJ-liposome by sucrose density gradient centrifugation. The uppermost layer of the sucrose gradient was collected and used. The final concentration of plasmid DNA was equal to 20  $\mu$ g/ml when  
20 calculated as previously reported (J. Clin. Invest. 93:1458-1464 (1994); Am. J. Physiol. 271:R1212-1220 (1996)). The method of preparation has been optimized so as to attain the maximum transfection efficiency.

### 3) In vivo gene introduction

25 In order to establish an efficient method of in vivo gene introduction, we have tested three different methods to deliver plasmid that formed a complex with the HVJ-liposome: 1) direct introduction

into the internal carotid artery, 2) injection into the lateral ventricle, and 3) injection into the cisterna (subarachnoid space).

For the introduction into the internal  
5 carotid artery, male Sprague Dawley rats (350-400 g) were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, intraperitoneal), and incision was made to the left common carotid artery, into which a polyethylene catheter (PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ) was  
10 introduced (Rakugi et al.). The distal region of the external carotid artery was isolated for a short time by closing with ligature temporarily. The HVJ-liposome complex (1 ml) was injected into the external carotid artery region. After injection, the injection canula  
15 was removed and the ligature was loosened to recover blood flow into the common carotid artery.

For injection into the lateral ventricle, the anesthetized rats were placed in a stereotaxic apparatus (Narishige Scientific Instrument Laboratory,  
20 Tokyo, Japan) to expose the cranium. A stainless steel canula (30 gauge; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with a specifically designed Teflon connector (FEP tube, Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) was introduced into the left lateral ventricle and  
25 previously described (Am. J. Physiol. 271:R1212-1220 (1996)). The stereotaxic coordinate was as follows: behind the bregma, 1.3 mm; side of the midline, 2.1 mm; and under the cranial surface, 3.6 mm. The HVJ-

liposome complex was injected to the lateral ventricle (20  $\mu$ l). After the injection of the HVJ-liposome complex, the injection canula was removed. No behavioral changes such as spasm in the extremities and abnormal movement were observed in any animal that received injection.

For injection into the subarachnoid space, the head of each animal was fixed at a horizontal position, and the atlantoccipital membrane was exposed by the midline incision of the occipital bone. A stainless steel canula (27 gauge; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) was introduced into the subarachnoid space. The position of the canula was confirmed, and in order to avoid increases in intracranial pressure, 100  $\mu$ l of cerebrospinal fluid was removed. Then the HVJ-liposome solution (100  $\mu$ l: 100  $\mu$ g/ml) was carefully injected into the cisterna (subarachnoid space) over more than one minute. Then the animal was placed with the head down for 30 minutes. A preventive dosage of antibiotics (30,000 U penicillin) was administered to complete the sterile procedure.

#### 4) Laser Doppler imaging

Using a laser Doppler imager (LDI), continuous blood flow was recorded for two weeks after the surgery. The LDI system (Moore Instruments Ltd., Devon, UK) has a 2 W built-in helium-neon laser in order to generate a beam that continuously scans to a

depth of 600  $\mu\text{m}$  of the tissue surface of  $12 \times 12$  cm. During scanning, blood cells moving in the blood system change the frequency of the incident light according to the Doppler principle. A photodiode collects the  
5 scattered light in the opposite direction, and thereby variation in the original light strength are converted into voltage variation in the range of 0-10 V. A perfusion output value at 0 V was graduated at 0% perfusion, and 10 V was graduated at 100% perfusion.  
10 After scanning is complete and the scattered light in the opposite direction is collected from all measurement sites, color-coded images showing blood flow are displayed on a television monitor. Perfusion signals are divided into six different sections, each  
15 being displayed as a distinct color. The reduced blood flow or no perfusion is indicated by dark blue, while the maximum perfusion is displayed as red.

Using the LDI, perfusion at the brain surface was recorded before, immediately after, 7 and 14 days  
20 after obstruction. Along the midline incision on the scalp, a bone window of  $12 \times 12$  cm was made using an electric drill. On this bone window, continuous measurement values were obtained. Color-coded images were recorded, and analysis was performed by  
25 calculating mean perfusion values for each rat. In order to consider variables containing ambient light and temperature, calculated values of perfusion were expressed as ratios of the brain after (ischemia) to

before (nontreatment).

5) Histopathological examination

After fixing in a 3% paraformaldehyde/20% sucrose solution for one day, 25  $\mu$ m frozen sections of coronal plane were made for every 100  $\mu$ m for use in X-gal staining. The sections were stained with X-gal to identify stained neurons that are expressing  $\beta$ -galactosidase. 25  $\mu$ m frozen sections of coronal plane were made for every 100  $\mu$ m for use in alkaline phosphatase (ALP) staining. These sections were incubated together with PBS containing 0.3% hydrogen peroxide to decrease endogenous peroxidase activity, and then were incubated with primary antibody diluted in PBS containing 10% equine serum or a lectin at room temperature for 60 minutes. After washing three times in a Tris buffered saline containing 2% equine serum, the biotin-tagged secondary antibody compatible with the species and then avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC kit, PK6100, Vector laboratories, Burlingame, CA) were incubated. Antibody binding was visualized using diaminobenzidine. Primary antibody was omitted and stained with unrelated immunoglobulin compatible with the type and class in order to use as a negative control for each antibody.

6) ELISA method on HGF and VEGF in the cerebrospinal fluid (CSF)

CSF (100  $\mu$ l) obtained from rats before, 7 and 14 days after the obstruction of the bilateral carotid

arteries was used in the experiments. Rat and human HGFs were determined by an ELISA kit (Institute of Immunology, Tokyo), and human VEGF was also determined by an ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN).

5 7) Experimental materials

cDNA of human HGF (Patent No. 2777678) was cloned by a standard method, which was inserted into an expression vector pcDNA (manufactured by Invitrogen) and used as human HGF gene.

10 cDNA of human VEGF165 (Science 246:1306 (1989)) was cloned by a standard method, which was inserted into an expression vector pUC-CAGGS and used as human VEGF gene.

Using a recombinant expression vector in  
15 which cDNA of human HGF (Patent No. 2777678) was inserted into an expression vector pcDNA (manufactured by Invitrogen), Chinese hamster ovary cells (ATCC) or C-127 cells (ATCC) were transfected, and from the culture medium thereof human recombinant HGF was  
20 purified by a standard method and used.

Based on the above materials and experimental method, the following Examples 1-4 were performed.

Example 1

Effect of the HVJ-liposome delivery system on in vivo  
25 transfection of  $\beta$ -galactosidase gene

As a gene to be introduced,  $\beta$ -galactosidase gene (manufactured by Invitrogen, concentration in HVJ-



liposome: 20 µg/ml) was used to prepare HVJ-liposome as described in the above materials and experimental method.

First, the HVJ-liposome complex was injected directly into the internal carotid artery and was allowed to reach the brain. However, in the intraarterial injection in the above carotid artery, little expression in the brain or microvascular endothelial cells was generated on day 3 and 7 after the injection (data not shown). Therefore, HVJ-liposome was injected into the lateral ventricle and the subarachnoid space. The injection of  $\beta$ -galactosidase gene by the HVJ-liposome method gave rise to marked expression of  $\beta$ -gal on day 3 and 7 after the injection (Fig. 1 and Fig. 2). When injected into the lateral brain,  $\beta$ -gal expression was mainly observed in the lateral ventricle and the perichoroidal plexus. In contrast, when injected into the subarachnoid space,  $\beta$ -gal expression was observed on the brain surface. The foregoing result revealed that injection into the subarachnoid space is better when the reduced blood flow in the brain is to be treated by angiogenesis.

#### Example 2

##### In vivo transfection of HGF gene and VEGF gene

In order to understand the effect of introduction of HGF gene and VEGF gene, the protein expression of these molecules in the cerebrospinal

fluid (CSF) was determined by an ELISA method (n=4, each group). First, human HGF and VEGF were determined in the CSF of the control rats (treated with an expression vector in which no HGF gene or VEGF gene were introduced) before, 7 and 14 days after the obstruction of the bilateral carotid arteries, and no concentration of these proteins was detected (Fig. 3 and Fig. 4).

Next, the concentration of human HGF protein was determined in the CSF of the rats in which HGF gene (concentration in HVJ-liposome: 20 µg/ml) was introduced into the subarachnoid space immediately after the carotid artery obstruction. On day 7 after transfection, human HGF was detected but not rat HGF (Fig. 3). There were no marked differences observed between the rats ( $1.63 \pm 0.16$  ng/ml) in which the carotid artery was obstructed and the rats ( $1.67 \pm 0.29$  ng/ml) in which the carotid artery was not obstructed. Even on day 14 after transfection, human HGF was detected ( $0.40 \pm 0.04$  ng/ml) (Fig. 3).

In a similar procedure to the above HGF gene, VEGF gene (concentration in HVJ-liposome: 20 µg/ml) was introduced into the subarachnoid space, and the concentration of human VEGF in the CSF was much lower than HGF (Fig. 4) (day 7;  $18.9 \pm 2.9$  pg/ml for the rats in which the carotid artery was not obstructed, and  $16.8 \pm 5.8$  pg/ml for the rats in which the carotid artery was obstructed, day 14;  $11.7 \pm 1.6$  pg/ml for the

rats in which the carotid artery was not obstructed, and  $9.9 \pm 1.5$  pg/ml for the rats in which the carotid artery was obstructed). The reason for these differences are unknown, but it appears that it is preferred to cause angiogenesis by applying HGF in order to treat chronic reduction in blood flow.

### Example 3

#### Angiogenesis on the brain surface by HGF transfection

Using the tissue of the rats that were treated as in Example 2, the effect of HGF gene introduction in the CNS on angiogenesis was confirmed. Thus, by performing histopathological analysis using an alkaline phosphatase (ALP) staining that detects vascular endothelial cells, endothelial cells in and around the brain were detected. In the rats in which HGF gene was not introduced, ALP-positive cells were limited to the inside of the brain before and 7 days after the obstruction of the bilateral carotid arteries (A and C in Fig. 5). Interestingly, in the the rats in which HGF gene was introduced, ALP-positive cells were observed on the brain surface, and more cells were observed on the brain surface in the rats in which the bilateral carotid arteries were obstructed than in the rats in which the bilateral carotid arteries were not obstructed (B and D in Fig. 5). These results suggested that the introduction of HGF gene caused angiogenesis in particular on the brain surface in an

ischemic state.

#### Example 4

##### Cerebral blood flow (CBF) in the rat measured by LDI

CBF in the rat was measured before and after  
5 the obstruction of the bilateral carotid arteries.  
First, changes in CBF of the rats in which gene was not  
introduced were analyzed before, immediately after, 7  
and 14 days after obstruction. As expected, CBF  
decreased immediately after obstruction of the  
10 bilateral carotid arteries, and gradually increased  
with time (Fig. 6). However, CBF was markedly lower on  
day 7 and 14 after obstruction compared to the non-  
treated rats (Fig. 6).

Next, the rats treated with recombinant HGF  
15 (200  $\mu$ g), HGF gene (concentration in HVJ-liposome: 20  
 $\mu$ g/ml), and a combination of recombinant HGF and HGF  
gene were measured. The HGF gene and recombinant HGF  
were injected to the subarachnoid space in a manner  
similar to that in Examples 2 and 3. Each treatment  
20 was performed 10 minutes after carotid artery  
obstruction. In the rats treated with recombinant HGF,  
no marked increases in CBF were observed compared to  
the control rats (control:  $886.1 \pm 99.6$ , recombinant  
HGF:  $985.5 \pm 142.4$ ) (Fig. 7). However, in the  
25 treatment with HGF gene introduction, CBF showed a  
marked increase on day 7 after obstruction ( $1214.5 \pm$   
 $145.1$ ). Furthermore, in the rats treated with a

combination of recombinant HGF and gene introduction, unexpectedly, CBF was much higher on day 7 compared to gene introduction alone ( $1490.3 \pm 197.9$ ). These results demonstrated that angiogenesis by the introduction of HGF gene improves chronic reduction in cerebral blood flow, and that the combination of the gene and recombinant HGF is the most effective when treated after arterial obstruction.

On the other hand, since VEGF gene also enhanced CBF ( $1122.8 \pm 265.3$ ) (Fig. 7), VEGF gene was also shown to be effective in improving reduced blood flow in the brain.

Next, the effectiveness of the treatment was investigated when it was performed before arterial obstruction. Interestingly, the treatment with HGF gene or VEGF gene before arterial obstruction prevented reduction in CBF due to carotid artery obstruction (control:  $459.4 \pm 97.4$ , HGF:  $796.8 \pm 204$ , VEGF:  $737.6 \pm 211.5$ ) (Fig. 8). These results indicate that when delivered before ischemia, the introduction of HGF gene and VEGF gene is effective in preventing reduced blood flow due to arterial obstruction.

## Experiment II.

### Study on the suppressive effect of neuronal death in the brain by HGF gene

#### Experimental method

The HVJ-liposome complex containing human HGF

gene and human recombinant HGF used in the experiment were prepared in the same manner as in the above Experiment I.

In the experiment, male Mongolian gerbils  
5 (weight: 50-70 g) were used. The animals were bred in a room of which temperature was maintained at 24°C and water and the feed were given ad libitum. The Mongolian gerbils were divided into five groups.  
"sham": the control group (group with no ischemic  
10 stimulation), "vehicle": the group with 5-min ischemia of the bilateral carotid arteries, "post G": the group with HGF gene introduction after 5-min ischemia of the bilateral carotid arteries, "pre G": the group with HGF gene introduction before 5-min ischemia of the  
15 bilateral carotid arteries, "post R": the group with one-time administration of recombinant HGF gene after 5-min ischemia of the bilateral carotid arteries.  
Wearing a face mask, anesthesia of 3% halothane was performed, and maintained at a mixed air of 1.5%  
20 halothane, 20% oxygen, and 80% nitrogen. Body temperature (the temperature of the rectum) was always monitored to maintain at around 37°C using a heat pad. After the bilateral carotid arteries were exposed, blood flow was completely blocked using a blood vessel  
25 clip for 5 minutes. Thereafter, the clip was released to restore blood flow. Immediately before or immediately after the surgical treatment, human HGF gene (20 µg) was introduced from the subarachnoid space

to the cerebrospinal cavity using the HVJ-liposome method. Recombinant HGF (30 µg) was given from the subarachnoid space to cerebrospinal cavity immediately after the surgical treatment. After the surgery also, 5 the cage was maintained at 37°C to wait for recovery to occur. The control group was treated in the same manner as in the other groups except blood flow blocking. On day 4 and 7 after ischemia, the brain was extracted and the sections were HE stained, TUNEL 10 stained, and immunostained before performing histopathological analysis. The concentration of HGF in the cerebrospinal fluid was measured using a human HGF ELISA analysis.

Based on the above experimental method, the 15 following Example 5 was performed.

#### Example 5

##### Suppression of neuronal death in the hippocampus CA-1 region by HGF gene transfection

Using normal Mongolian gerbils, the 20 introduction of gene from the subarachnoid space to the cerebrospinal cavity by the HVJ-liposome method was confirmed. When  $\beta$ -galactosidase gene was introduced and the sections of the brain were  $\beta$ -gal stained, gene expression was observed on the brain surface and the 25 hippocampus CA-1 region (Fig. 9).

By ischemia for 5 minutes at the bilateral carotid arteries, delayed neuronal death was observed

in the hippocampus CA-1 region of the brain (Fig. 10, the vehicle group). In contrast, the administration of HGF gene (the PreG group and the PostG group) or recombinant HGF (the PostR group) significantly  
5 suppressed delayed neuronal death (Fig. 11 and Fig. 12). When HGF concentration in the cerebrospinal fluid of the PostG group was measured by an ELISA method, HGF expression was observed even after 7 days (Fig. 13). Thus, HGF was found to be effective in suppressing  
10 delayed neuronal death due to cerebral ischemia.

When the expression site of a HGF receptor, c-Met, was investigated by an immunostaining method, expression was observed in the CA-1 region indicating that HGF signals are transmitted through c-Met (Fig.  
15 14).

Furthermore, when nerve cells that had apoptosis in the CA-1 region were stained by the TUNEL method, apoptosis of nerve cells was observed in abundance in the vehicle group (Fig. 15). In contrast,  
20 little apoptosis was detected in the HGF gene administration group (the PreG group and the PostG group) (Fig. 15). Thus, the administration of HGF gene was thought to suppress apoptosis of nerve cells. In order to investigate the mechanism of suppression,  
25 expression in the CA-1 region of Bcl-xl and HSP70 having a apoptosis-suppressing effect was examined by immunostaining. The expression of Bcl-xL is shown in Fig. 16, and that of HSP70 is shown in Fig. 17 and Fig.



18. Expression of both proteins was confirmed in nerve cells by the administration of HGF gene. The foregoing revealed that the administration of HGF gene induces the expression of Bcl-xL and HSP70 and suppresses the apoptosis of nerve cells.

#### Industrial Applicability

In accordance with the present invention, there may be provided novel therapeutic or preventive agents for cerebrovascular disorders comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient, and novel administration methods comprising administering said therapeutic or preventive agents to the subarachnoid space.

## CLAIMS

1. A therapeutic or preventive agent for cerebrovascular disorders, said agent comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient.
2. A therapeutic or preventive agent according to claim 1 wherein cerebrovascular disorders are cerebrovascular obstruction, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, stroke, cerebral bleeding, moyamoya disease, cerebrovascular dementia, Alzheimer's dementia, and sequelae of cerebral bleeding or cerebral infarction.
3. A therapeutic or preventive agent for reduced blood flow in the brain comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient.
4. A promoting agent for angiogenesis in the brain comprising HGF gene and/or VEGF gene as an active ingredient.
5. A suppressing agent for neuronal death in the brain comprising HGF gene as an active ingredient.
6. The suppressing agent according to claim 5 wherein neuronal death in the brain is delayed neuronal death caused by cerebral ischemia.
7. A suppressing agent for apoptosis of nerve cells in the brain comprising HGF gene as an active ingredient.
8. The agent according to any one of claims 1-7 which comprises HGF gene and/or VEGF gene as an active

ingredient and which is to be used in combination with HGF protein and/or VEGF protein.

9. The agent according to claim 8 which comprises HGF gene as an active ingredient and which is to be used in combination with HGF protein.

10. The agent according to any one of claims 1-9 wherein HGF gene and/or VEGF gene are in the form of HVJ-liposome.

11. The agent according to any one of claims 1-10 to be administered into the subarachnoid space.

12. The method of producing the agent according to any one of claims 1-11 comprising blending HGF gene and/or VEGF gene with a pharmaceutically acceptable solvent.

13. A therapeutic or preventive method for cerebrovascular disorders comprising introducing HGF gene and/or VEGF gene into humans.

14. A therapeutic or preventive method for reduced blood flow comprising introducing HGF gene and/or VEGF gene into humans.

15. A method of promoting cerebral angiogenesis comprising introducing HGF gene and/or VEGF gene into humans.

16. A method of suppressing neuronal death in the brain comprising introducing HGF gene into humans.

17. A method of suppressing apoptosis of nerve cells in the brain comprising introducing HGF gene into humans.

18. The method according to any one of claims 13-17 comprising administering HGF gene and/or VEGF gene into the subarachnoid space in humans.

19. The method according to any one of claims 13-18 comprising administering HGF protein and/or VEGF protein together with the introduction of HGF gene and/or VEGF gene.

20. The method according to claim 19 comprising administering HGF protein together with the introduction of HGF gene.

21. Use of HGF gene and/or VEGF gene in the manufacture of a therapeutic or preventive agent for cerebrovascular disorders.

22. Use of HGF gene and/or VEGF gene in the manufacture of a therapeutic or preventive agent for reduced blood flow in the brain.

23. Use of HGF gene and/or VEGF gene in the manufacture of a promoting agent for angiogenesis in the brain.

24. Use of HGF gene in the manufacture of a suppressing agent for neuronal death in the brain.

25. Use of HGF gene in the manufacture of a suppressing agent for apoptosis of nerve cells in the brain.

## ABSTRACT

By introducing hepatocyte growth factor (HGF) gene and/or vascular endothelial growth factor (VEGF) gene into the subarachnoid space in humans, cerebrovascular disorders such as cerebrovascular obstruction, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, stroke, cerebral bleeding, moyamoya disease, cerebrovascular dementia, and Alzheimer's dementia can be effectively treated or prevented.

FIG. 1

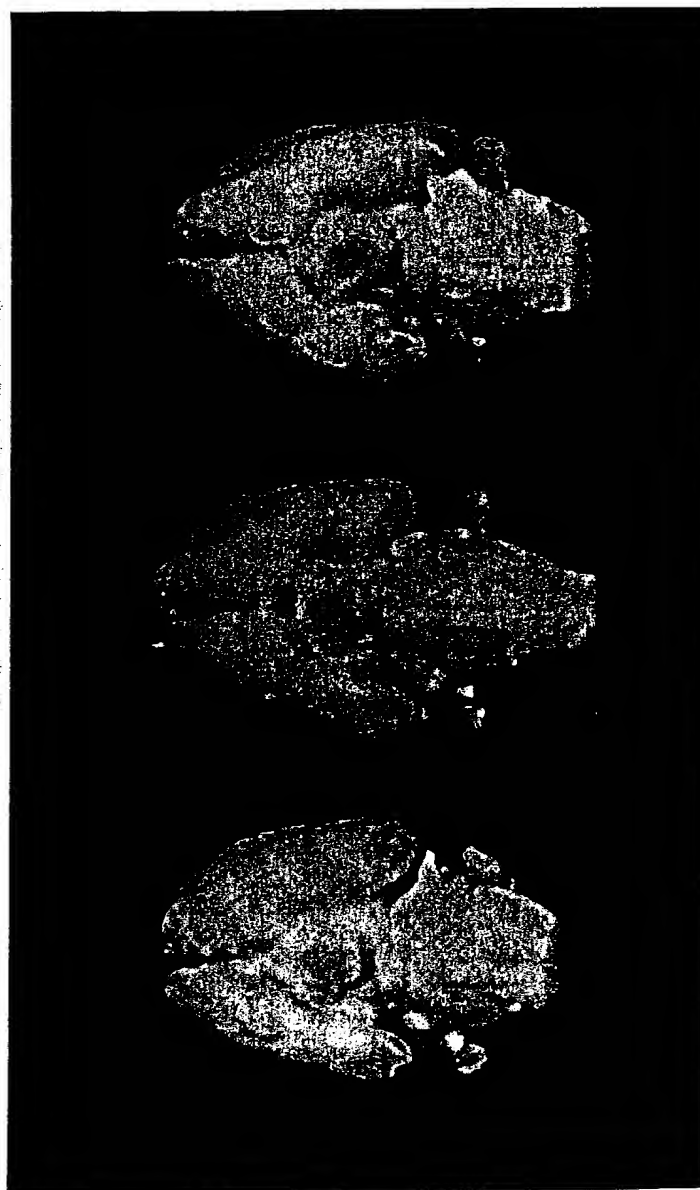


FIG. 2

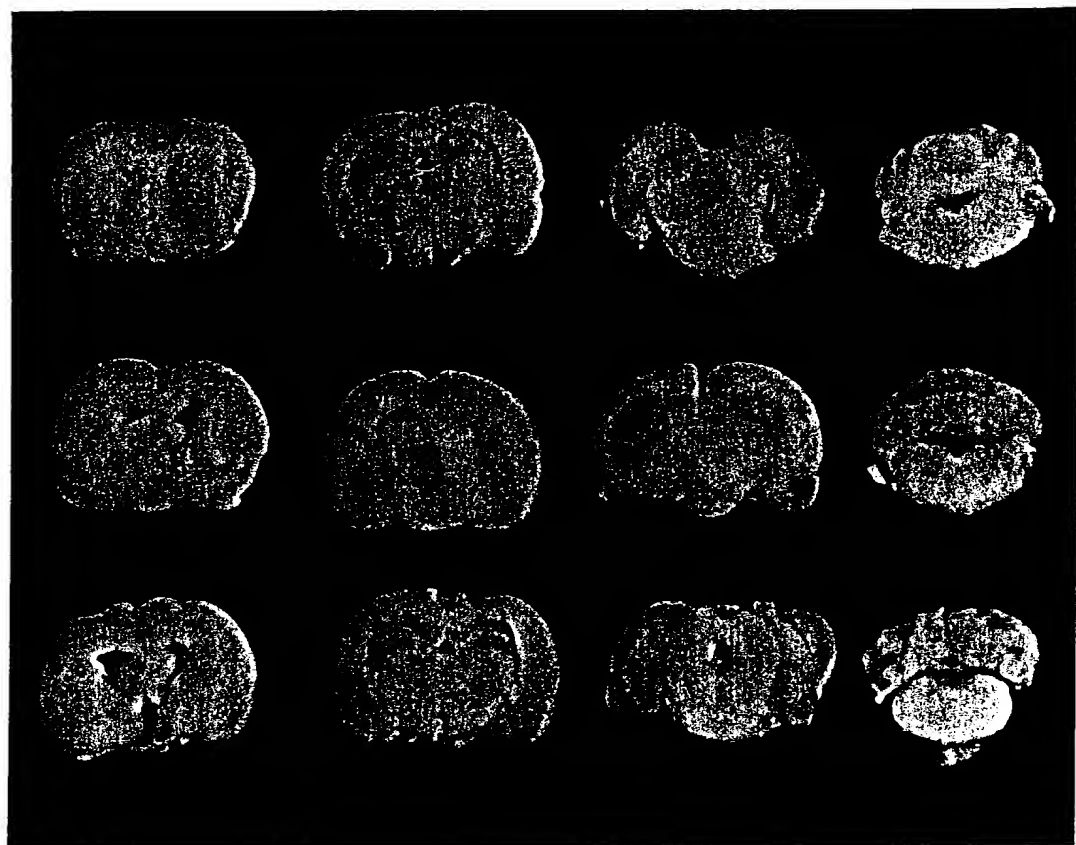


FIG. 3

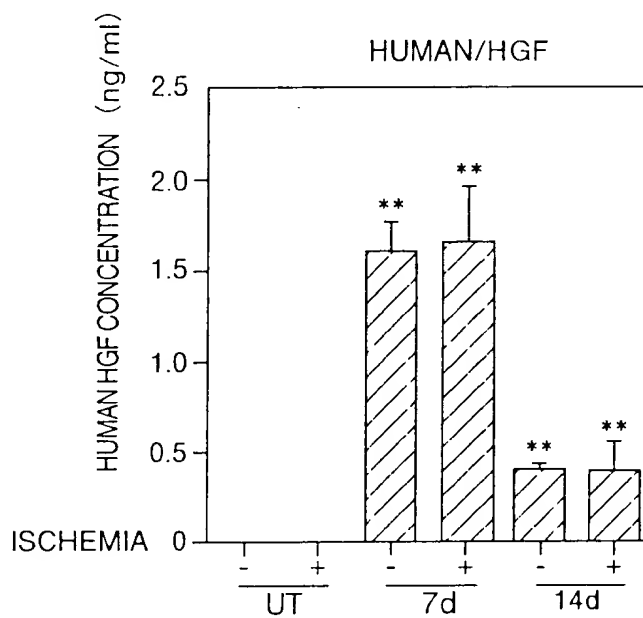


FIG. 4

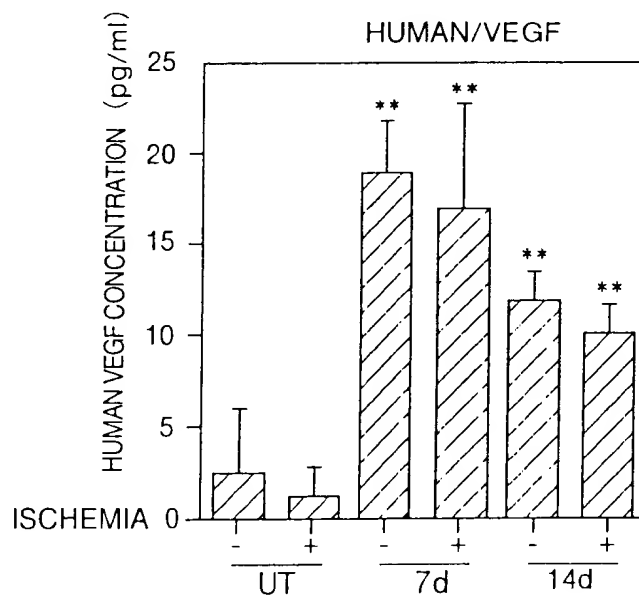




FIG. 5

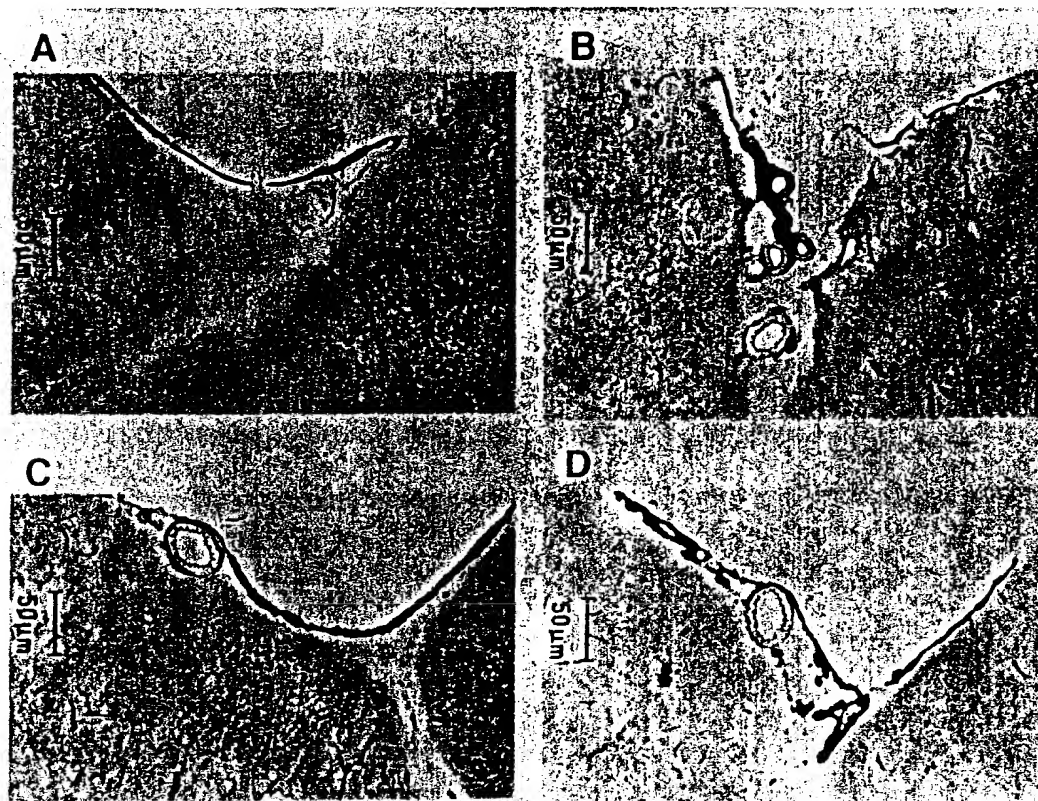


FIG. 6

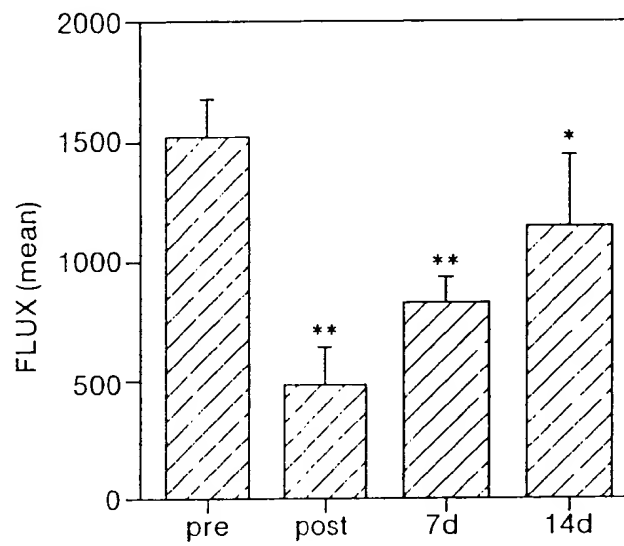


FIG. 7

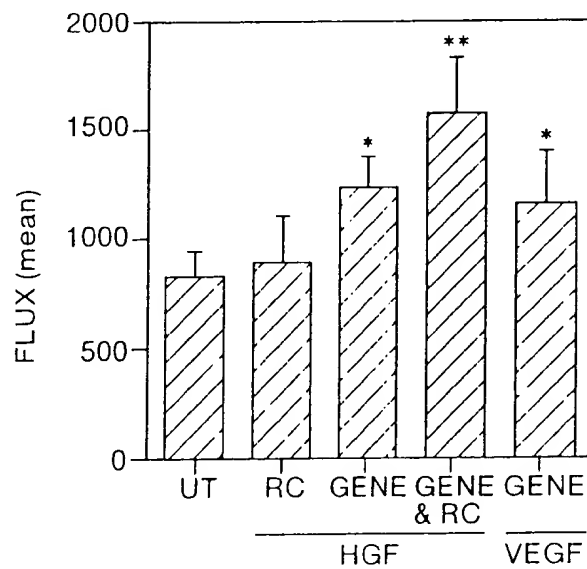


FIG. 8

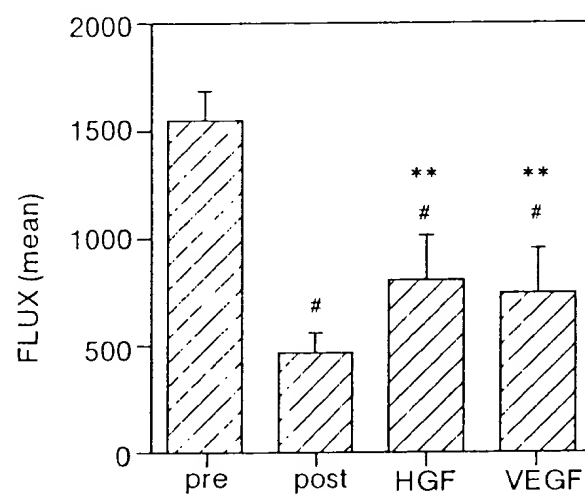


FIG. 9

*$\beta$ -Gal stain*

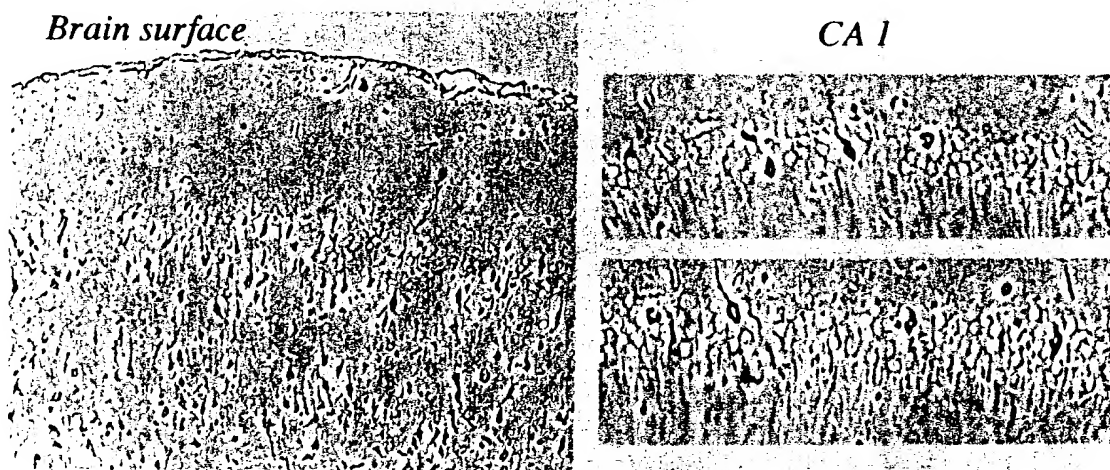


FIG. 10

*Delayed neuronal death*

*Sham ope. 7days*



*Vehicle 4days*



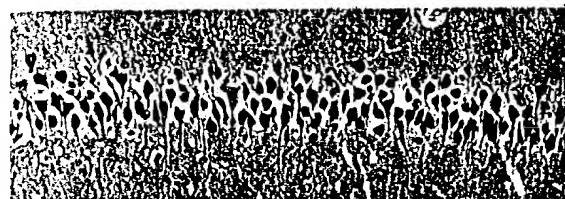
*Vehicle 7days*



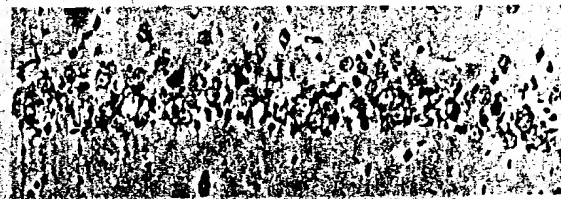
*HE stain*

FIG. 11

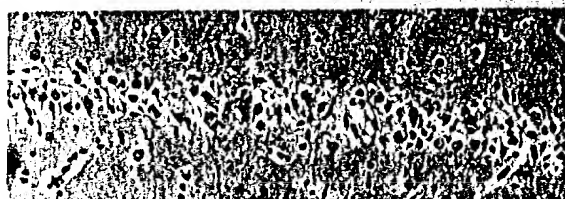
*HGF injection*



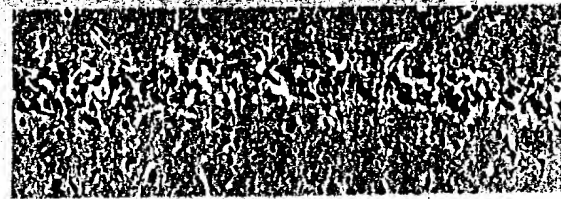
Post HGF gene 4days



Post HGF gene 7days



Pre HGF gene 7days



r-HGF 30  $\mu$ g 7days

FIG. 12

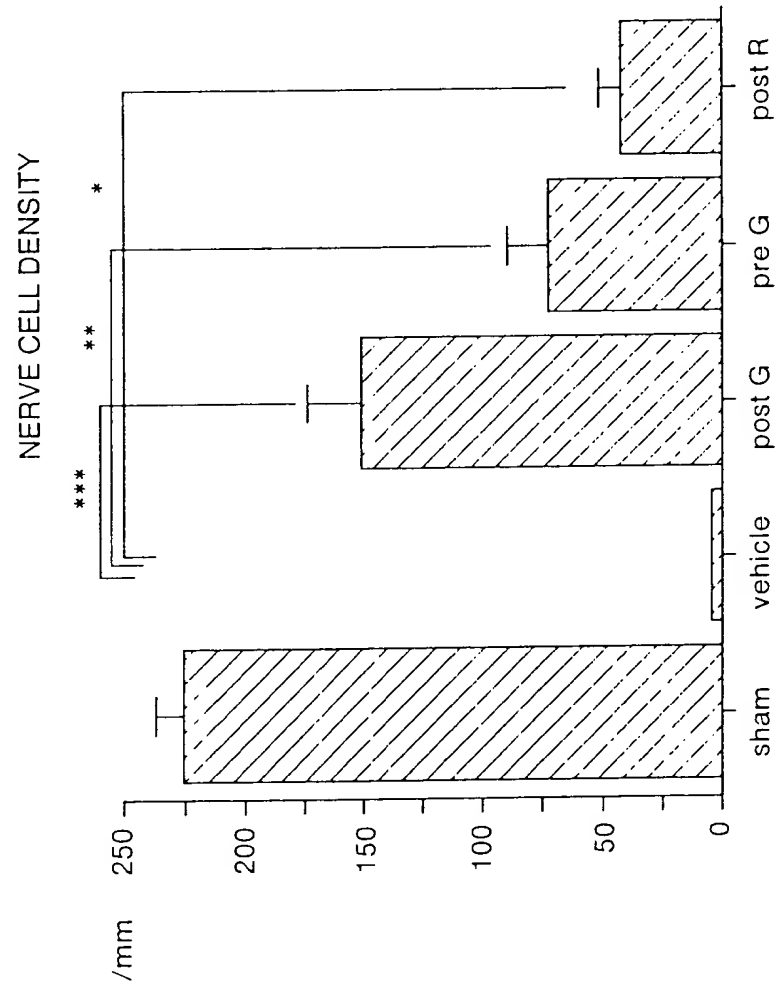


FIG. 13

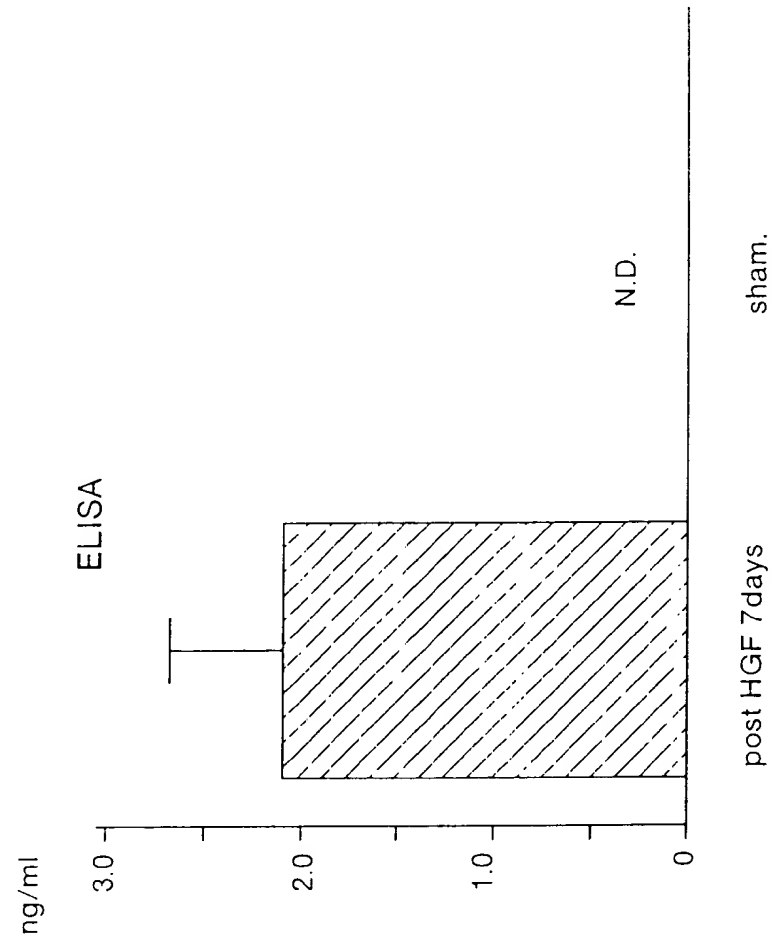




FIG. 14

*C-Met*

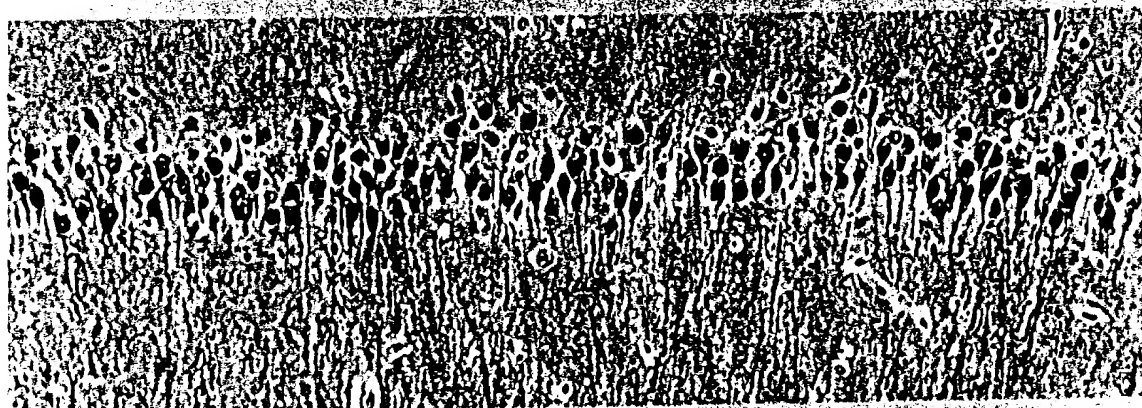
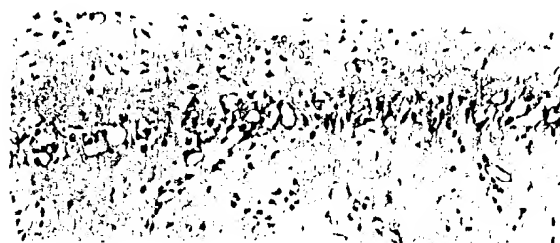


FIG. 15

*TUNEL*

*DND 7days*



*Post HGF gene 7days*



*Pre HGF gene 7days*

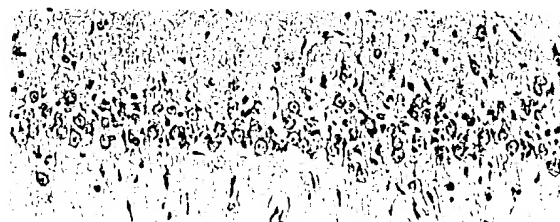
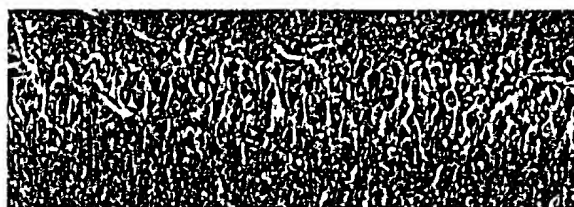


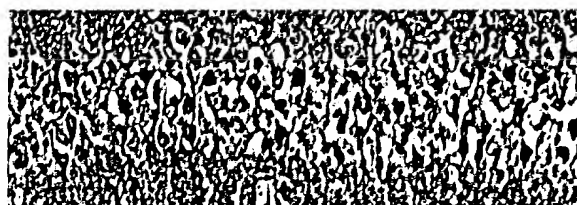
FIG. 16

*bcl-xL*

*sham.*



post HGF 4days

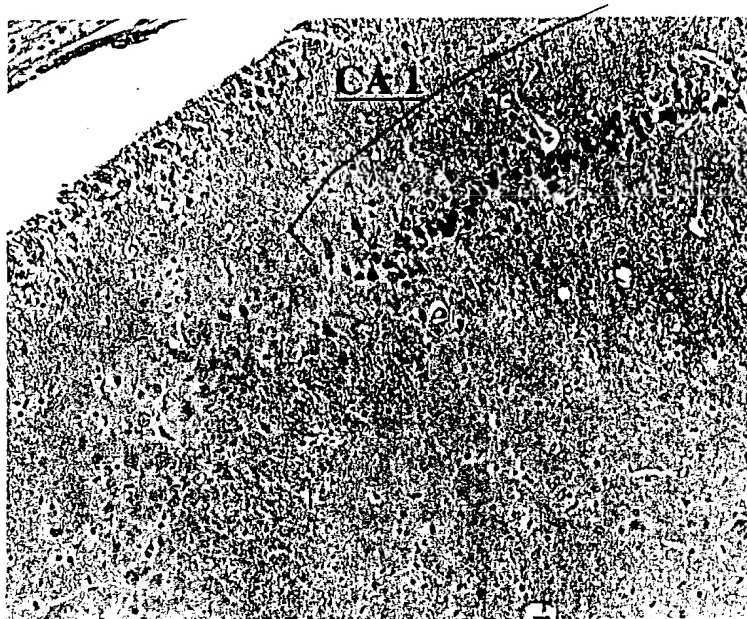


post HGF 7days



FIG. 17

*HSP 70*

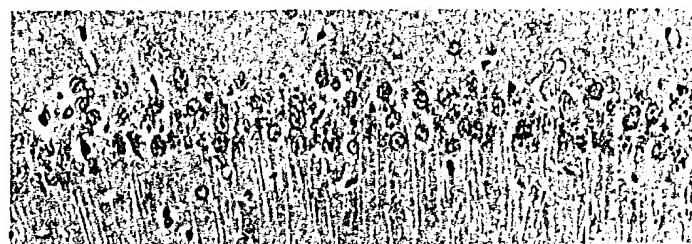


*post HGF 7days*

FIG. 18

*HSP70*

Sham.



Post HGF 7D

